



Onderzoekingen over de Diazoreactie op Serumbilirubine

Lane Medical Library

W. J. H. BUNGENBERG DE JONG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**ONDERZOEKINGEN OVER DE DIAZOREACTIE OP
SERUMBILIRUBINE**

Onderzoekingen over de Diazoreactie op Serumbilirubine

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
DR. E. LAQUEUR, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER GENEESKUNDE, IN
HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN
DE AULA DER UNIVERSITEIT
OP WOENSDAG 2 JUNI 1937 DES NA-
MIDDAGS 4.30 UUR PRECIES

DOOR

WILLEM JOHAN HERMAN BUNGENBERG DE JONG
GEBOREN TE IJSSELSTEIN

1 9 3 7

N.V. DRUKKERIJ EN UITGEVERSZAAK DE MERCUUR
HILVERSUM

Aan mijn Vader.

Aan de nagedachtenis mijner Moeder.

Bij het verschijnen van dit proefschrift is het mij een behoefte U, Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren en Docenten van de Medische en Philosophische Faculteiten der Utrechtsche Universiteit, te danken voor het onderricht, dat ik van U mocht ontvangen.

In het bijzonder geldt mijn dank U, Hooggeleerde H i j m a n s v a n d e n B e r g h. Uwe colleges wekten mijn voorliefde voor vraagstukken der Interne Geneeskunde en de kennisneming van Uwe publicaties gaf den stoot tot het ontstaan van dit proefschrift. Ik ben U voor een en ander zeer erkentelijk.

Hooggeleerde R u i t i n g a, Hooggeachte Promotor. Ik ben U grooten dank verschuldigd voor het feit, dat Gij, hoewel ik niet de eer had onder Uw leiding te zijn gevormd, toch mijn Promotor wildet zijn en Uw Laboratorium te Amsterdam voor mij open steldet.

Zeer ervaren O v e r b o s c h. Gedurende den tijd, op Uw interne afdeling in het Ziekenhuis Calvariënberg te Maastricht doorgebracht, verwierf ik het inzicht, welk nuttig werk voor den intern-geneeskundige kan zijn weggelegd.

Het is mij van groot nut geweest, zeer geleerde O u d e n d a l, dat ik eenigen tijd in het Sanatorium Oranje Nassau's Oord als assistent werkzaam was.

Gedurende den korten tijd dat Gij als Directeur van het Gemeente Ziekenhuis aan den Coolsingel te Rotterdam mijn chef waart, leerde ik, zeergeleerde B u r g e r h o u t, reeds Uw klinische en menschenkennis waardeeren.

Zeergeleerde W e s t r a. De jaren die ik als assistent van het Rotterdamsche ziekenhuis aan den Coolsingel op Uw afdeling werkzaam mocht zijn, werden een bron van ervaring voor mij. Die jaren leerden mij U, zeer ervaren v a n d e r S a n d e, kennen als een bij uitstek bekwaam clinicus. Uw onovertrefbare praktische en theoretische kennis en Uw groote algemeene ontwik-

HOOFDSTUK I

De diazoreactie op bilirubine. Geschiedenis, wijzen van uitvoering, directe en indirecte reactie, biphasische reactie.

De vraag of het normale menselijke bloedserum bilirubine bevat is lange jaren een punt van onderzoek en strijd geweest. Reeds Aucher¹³⁾ en Popper¹⁰²⁾ meenden, dat het hun gelukt was om bilirubine hierin aan te toonen. Gilbert⁶⁷⁾ kon met een door hem ontworpen oxydatiereactie de aanwezigheid van bilirubine waarschijnlijk maken; daar echter bij deze reactie ook luteïne een kleur gaf, was absolute zekerheid nog niet verkregen.

In 1913 gelukte het aan Hijmans van den Bergh⁹⁶⁾ met behulp der diazoreactie bilirubine in het bloed van normale personen aan te toonen. De methode berustte op de waarneming van Ehrlich^{43, 44, 45)}, dat bilirubine met benzolsulfonzuur-diazoniumchloride in zuur milieu een azoverbinding vormt.

Reeds Pröscher¹⁶¹⁾ had in 1900 de diazoreactie bestudeerd en het acetophenoazobilirubine in zuiveren toestand bereid. Hij maakte er op opmerkzaam, dat van de galkleurstoffen biliprasine en bilifuscine eveneens deze reactie gaven; biliverdine gaf haar niet.

Welke verbindingen men voor het diazoteeren gebruikte, bleek niet van veel belang. Zoowel diazobenzolsulfozuurchloride als amidoacetophenon bleken in alcoholisch milieu met bilirubine in reactie te treden. Zijn belofte om een beschrijving van deze reactie voor klinische doeleinden mede te deelen, kwam hij niet na.

Bij het bestudeeren der eigenschappen van het azobilirubine genoot Pröscher de medewerking van Formanek⁶¹⁾, die een beschrijving van de spectroscopische eigenschappen dezer stof gaf.

Voor Hijmans van den Bergh bleef het weggelegd de reactie van Ehrlich en Pröscher in de kliniek toe te passen. Tezamen met Snapper en Muller¹⁰²⁻⁹⁷⁻⁹⁶⁾ ver-schafte hij daarmede aan de kliniek een methode van onderzoek van moeilijk te overschatten beteekenis. Deze onderzoekingen werden samengevat in een monographie „Der Gallenfarbstoff im Blute” (Leiden 1918, herdrukt 1928)¹⁰²⁾.

Naast een schatting van de hoeveelheid bilirubine in het bloedserum was een der meest waardevolle resultaten van zijn studie het vaststellen van het feit, dat bilirubine bevattend bloedserum niet steeds op dezelfde wijze met het diazoreagens reageert. Hij bemerkte, dat bij ziekten, die gepaard gingen met afsluiting van de galwegen, een galkleurstof in het bloedserum verscheen, die binnen 30 seconden met diazoreagens rood werd. Bij galblaasgal werd hetzelfde snelle verkleuren waargenomen; hij noemde dit de directe reactie.

Anders was het echter gesteld met het bloedserum van patiënten, die leden aan wat hij noemde dynamische icterus (bijv. haemolytische icterus en pernicieuze anaemie). Ook hierbij bleek het serum een meer dan normale hoeveelheid galkleurstof te bevatten, die echter, samengebracht met het diazoreagens, slechts een langzaam optredende verkleuring gaf. Het duurde eenige minuten voor het azobilirubine ontstond en een totale omzetting in azobilirubine werd niet verkregen.

Indien men de eiwitten van een dergelijk serum neersloeg met het dubbele volumen 96% alcohol en na filtratie aan het alcoholische filtraat diazoreagens toevoegde, trad een prompte reactie op; hij noemde deze werkwijze de indirecte reactie. Deze indirecte reactie kon ook met direct reageerend serum verkregen worden. Serum van patiënten met mechanische icterus vertoonde dus de directe zoowel als de indirecte reactie. Serum van patiënten met dynamische icterus vertoonde slechts de indirecte reactie. Onder een positieve directe reactie verstond hij dus de vorming van azobilirubine binnen 30 seconden en wel maximaal.

In een dergelijke tijdgrens zit steeds iets willekeurigs. Het is toch moeilijk in te zien, dat een serum, dat de maximale koppe-

ling in bijv. 60 seconden geeft, niet direct zou zijn, en dat de diagnose daardoor in een andere richting zou geleid worden. De tijd van 30 seconden is dan ook minder van belang dan het maximaal worden van de koppeling in korten tijd.

In groote trekken zijn de klinische conclusies, die H ij m a n s v a n d e n B e r g h uit het gedrag van sera ten opzichte van het diazoreagens trok, bevestigd. Eenige schrijvers zagen in gevallen, waar de galstuwung als oorzaak van de icterus vaststond, geen directe reactie (S c h i f f e n E l i a s b e r g ¹⁷⁸), B l u m ²⁷), H o l l o s ⁹⁰), zie verder M a n n e n B o l l m a n ¹³⁵)).

Enkele onderzoekers hechten weinig waarde aan het verschil tusschen directe en niet directe reactie (C h a b r o l ³⁴⁻³⁵), F a v e l l i ⁵³). Deels kan dit het gevolg zijn van afwijkende techniek, waarover later meer. Ook volgens D a d d i ⁴⁰) ziet men met een door hem samengesteld reagens geen verschil tusschen directe en indirecte sera. Echter lijkt zijn techniek in chemisch opzicht niet meer op die van H ij m a n s v a n d e n B e r g h.

Deze laatste ging bij zijn methode om na te gaan of een serum direct reageerde, als volgt te werk. Aan 1 volume serum voegde hij 1 volume (of meer) water toe; bij dit mengsel bracht hij $\frac{1}{4}$ tot $\frac{1}{2}$ volume reagens; indien nu de roode verkleuring binnen 30 seconden en (volgens hem) maximaal optrad, werd de reactie direct genoemd.

L e p e h n e ^{127, 128, 129, 130, 131}) die het werk van H ij m a n s v a n d e n B e r g h nadeed en het vrijwel geheel bevestigde, bracht eenige veranderingen aan in de techniek der kwalitatieve reactie. Hij gebruikte twee contrôlebuizen naast de proefbuis; de 1e buis bevatte 0,25 cc serum + 0,2 cc water, de 2e buis bevatte 0,25 cc serum + 0,2 cc diazoreagens, waarin eenige kristalletjes benzoas naticus cum coffeïno waren opgelost. A d l e r e n S t r a u s z ²⁻³⁻⁴) hadden namelijk ontdekt, dat deze stof de omzetting van het niet direct reageerende bilirubine even snel maakte als die van het direct reageerende zonder de toevoeging. De 3e buis bevatte 0,25 cc serum + 0,2 cc diazoreagens.

Hij had dus een buis, waarin maximaal gekoppeld was (no. 2)

en een waarin geen koppeling plaats vond (no. 1), ter vergelijking met het te onderzoeken serum (no. 3).

Lepéhne gebruikt dus een andere verhouding van serum en reagens, laat de watertoevoeging achterwege en voert vergelijkingsbuisen in. Vooral wat betreft buis no. 1 was dit een groote verbetering. Buis no. 2 was een minder belangrijke verbetering, daar deze buis een meer kersroode kleur heeft dan de eenvoudige koppeling van no. 3. De reden hiervan zal later blijken.

Mc Nee en Keefer¹⁵²⁾ vonden de werking van benzoas natricus cum coffeïno zeer inconstant, doch raden wel aan deze vergelijkingsbuis te gebruiken.

De mogelijkheid bestaat, dat de door Lepéhne veranderde techniek resultaten zal opleveren, die verschillen met die verkregen volgens de methode zooals Hijmans van den Bergh deze aangaf. Een poging van Lepéhne om de reactie als ringreactie uit te voeren, bood geen voordeelen. Later werd door o.a. Rozendaal, Comfort en Snell¹⁷⁵⁾ en Chabrol weer een ringreactie gebruikt.

Lepéhne kon zich niet vereenigen met de eenvoudige in-deeling in directe en niet directe (dus indirecte) sera, zooals Hijmans van den Bergh deze had voorgesteld. Reeds Feigl en Querner⁷⁴⁾ hadden waargenomen, dat de reactie vaak zooals zij het uitdrukten, biphasisch verliep, d.w.z. dat de reactie snel inzet, om na eenigen tijd langzaam verder te verlopen. Een dergelijk verloop nam Lepéhne tot grondslag van zijn schema, hetwelk als volgt was samengesteld:

- a. directe reactie: maximale roodkleuring in 10 tot 30 seconden;
- b. vertraagd directe reactie: begin der roodkleuring na 1—15 minuten (soms nog later), die langzaam sterker wordt;
- c. tweefasische reactie: dadelijk treedt roodkleuring op, welke na 1 of 2 meer minuten sterker wordt.

Hij verdeelt c nog in:

tweefasisch prompt: d.w.z. het grootste deel van het aanwezige bilirubine geeft een directe reactie;

tweefasisch vertraagd: d.w.z. het grootste deel van het

bilirubine geeft een vertraagde reactie;

- d. indirecte reactie: geen verkleuring treedt op met het diazo-reagens. Pas na alcohol-(aceton-)toevoeging heeft de koppeling plaats.

Een dergelijk schema werd gebruikt door Mc Nee en Keefe¹⁵²⁾. Andrewes⁸⁻¹⁰⁾ zag nooit een directe reactie in den zin van Lepehne en Hijmans van den Bergh; hij noemde daarom een reactie direct, als de kleurverandering binnen 30 seconden begon. Een bezwaar hiertegen is dat bijna alle sera, indien zij in een dikke laag bekeken en vergeleken worden, wel eenige kleurverandering vertoonen; men is dan genoodzaakt te schatten welke verandering in tint men tot de directe reactie zal rekenen en welke niet.

Andrewes' opmerking, dat de koppeling in 30 seconden nooit maximaal is, zal door de meesten, die de reactie veel toepassen, onderschreven kunnen worden. Hartog⁸³⁾ kon op aansporing van Hijmans van den Bergh dit ook quantitatief aantonen.

Veelal werd bij het uitvoeren der kwalitatieve directe reactie het toevoegen van water achterwege gelaten en een grootere hoeveelheid diazoreagens toegevoegd dan Hijmans van den Bergh oorspronkelijk voorschreef. Of dergelijke willekeur in de techniek vergelijkbare resultaten zal leveren is te betwijfelen.

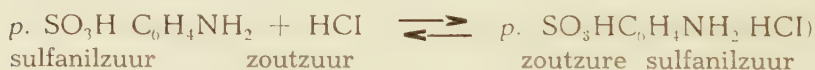
De verdeeling der sera in directe en indirecte gaf ook in zoverre aanleiding tot verwarring, dat de eigenschap van het „indirecte” reageeren eigenlijk aan alle sera toekomt. Het lijkt daarom praktischer te spreken over direct of prompt reagerend bilirubine in tegenstelling met vertraagd. Indien men wil, kan men den term biphasisch gebruiken in die gevallen, waar blijkbaar de beide modificaties naast elkander voorkomen. Ieder serum dat door pathologische omstandigheden direct bilirubine bevat, zou biphasisch van reactie moeten zijn. Immers, Hijmans van den Bergh stelde vast, dat ieder menschelijk bloedserum een weinig vertraagd reagerend bilirubine bevatte. Indien hier nu stuwingsbilirubine bijkomt, is een biphasische reactie ontstaan (Hannema⁷⁷⁾). Echter zal het vertraagde deel van deze

reactie moeilijk te zien zijn als de hoeveelheid direct reageerend bilirubine groot is. Inderdaad is ook de biphasische reactie een zeer veel voorkomend verschijnsel. Men zal in 't algemeen kunnen zeggen, dat, als gepaard gaan stuwings- en beschadiging van het leverparenchym, men een biphasische reactie kan verwachten, dat is dus bij allerlei vormen van hepatitis.

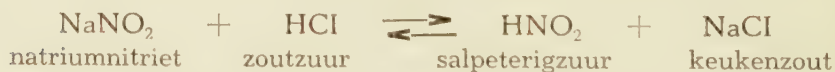
Zooals uit het voorgaande bleek, werd de techniek der kwalitatieve galkleurstofreactie door de verschillende onderzoekers niet constant gehouden. In het algemeen is een systematisch onderzoek over den invloed, dien de concentratie van de verschillende componenten van het diazoreagens op den uitslag der reactie heeft, in de literatuur niet te vinden. Deze lacune te vullen was de eerste opgave, die wij ons bij de bewerking van dit proefschrift stelden.

Het diazoreagens bestaat uit sulfanilzuur, zoutzuur, natriumnitriet, keukenzout en water, van welke vijf componenten de rol achtereenvolgens zal besproken worden. De verhouding waarin deze stoffen in het reagens van H ij m a n s v a n d e n B e r g h zijn samengevoegd, is de volgende:

1 gr. sulfanilzuur wordt opgelost in water, dat per liter 15 cc 25 % zoutzuur bevat: diazo A. Bij 10 cc diazo A wordt 0,3 cc gevoegd van een ½ % oplossing van natriumnitriet in water: diazo B. Deze stoffen gaan onderling reacties aan, die waarschijnlijk als volgt verlopen:



Deze laatste stof is in het diazo A opgelost in verdund zoutzuur. Na toevoeging van diazo B geschiedt het volgende:



Het salpeterigzuur reageert als volgt met het zoutzuursulfanilzuur:



Er vormt zich benzolsulfonzuurdiazoniumchloride. Deze stof kan, onder daarvoor geschikte omstandigheden, met bilirubine in reactie treden onder vorming van azobilirubine.

Azobilirubine is een indicator: in sterk zuur milieu is de kleur blauw, in minder sterk zuur milieu is de kleur paars, in zwak zuur, neutraal en zwak alcalisch milieu is de kleur rose of rood, in sterk alcalisch milieu is de kleur groen.

We merkten echter op, dat in de buurt van pH 10 de kleur paars kan zijn, met een sterk blauwen inslag. (Zie bladz. 30.)

Niet alle onderzoekers gebruikten het hierboven genoemde recept. Thannhauser en Andersen¹⁹⁵), Adler en Strausz²⁾, Kerppola en Leikola¹¹³), Peter¹⁵⁷) enz. stelden hun reagens zoo samen, dat het méér sulfanilzuur bevatte, zooals ook bij een der recepten van Ehrlich het geval was. Ook de hoeveelheid natriumnitriet was niet bij alle onderzoekers constant. Later zal in aparte hoofdstukken een en ander nader besproken worden.

Wij zullen in het vervolg enkele malen een schrijfwijze gebruiken, waarbij wij de samenstelling van het diazoreagens als volgt aangeven: het reagens door Hijmans van den Bergh gebruikt, dat per liter 1 gr. sulfanilzuur, 15 cc 25 % zoutzuur en op 10 cc van dit mengsel 0,3 cc van een ½ % natriumnitriet-oplossing bevatte, schrijven wij dan:

$$1/1000 \quad + \quad 15/1000 \quad + \quad 0,3.$$

Wij zullen nu overgaan tot de bespreking van de verschillende stoffen, waaruit het diazoreagens is samengesteld.

HOOFDSTUK II

Het nitrietgehalte van het diazoreagens.

Reeds Thannhauser en Andersen¹⁹⁵⁾ maakten er op opmerkzaam, dat vermeerdering der hoeveelheid nitriet in het reagens de diazoreactie van het bilirubine versnelt; door meer nitriet toe te voegen, zouden zij in een vertraagd reageerend serum een directe reactie hebben teweeggebracht. Daar het type der reactie door een zoo kleine wijziging omgekeerd werd, twijfelden zij of er wel twee soorten van bilirubine bestaan.

Adler en Strausz²⁾ konden hun waarneming niet bevestigen, maar hun eigen proef was niet dezelfde. Inplaats van zooals Thannhauser en Andersen gedaan hadden, het nitrietgehalte van het reagens te vermeerderen en dan eerst het serum toe te voegen, voegden zij achteraf, na de menging van het diazoreagens met het serum, aan het mengsel meer nitriet toe, en zagen dan geen versnelling der reactie; dit zijn dus andere proefvoorwaarden. Het zoutzuur van het diazoreagens is na de menging met serum niet meer zoo goed in staat om salpeterig zuur te vormen als zonder dit serum het geval is, daar het grootste deel van het zoutzuur dan aan de serumbuffers gebonden is.

Weltman en Hückel²⁰¹⁾ zagen wel reactieversnelling der traag reageerende sera door meer nitriet aan het reagens toe te voegen.

Hijmans van den Bergh waarschuwt tegen overmaat van salpeterigzuur in het reagens, welke overmaat hij controleert door joodkali-zetmeel; van versnelling door grooter nitrietgehalte van het diazoreagens gewaagt hij niet.

Ehrlich gebruikte in zijn oorspronkelijk diazoreagens een zeer geringe hoeveelheid nitriet, een korreltje opgelost in een

liter vloeistof. In een volgende publicatie veranderde hij de samenstelling van zijn reagens; ook hierin was het nitrietgehalte gering, $\frac{1}{10}$ gram natriumnitriet, 5 gr. sulfanilzuur, 50 cc 25 % zoutzuur per liter water. Dit nitrietgehalte komt overeen met het door Hijmans van den Bergh gebruikte. Chiray en Thiebaut³⁶⁾ gebruikten zelfs een 5 % oplossing van natriumnitriet.

Om den invloed van het nitrietgehalte na te gaan werden door ons eenige proeven verricht, waarbij het serum gemengd werd met diazoreagens, dat een opklimmende hoeveelheid natriumnitriet bevatte. De sterkte der door ons gebruikte natriumnitrietoplossing werd bepaald; zij bleek 0,479 % te zijn. De reagentia waren zoo samengesteld, dat zij per 10 cc diazo I 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,—; 1,1; 1,2 cc dezer natriumnitrietoplossing bevatten. Nu werd in een 10-tal buisjes telkens 1 cc vertraagd reageerend serum gebracht, hierop voorzichtig, om menging te voorkomen, 1 cc physiologische keukenzoutoplossing en vervolgens in ieder buisje $\frac{1}{2}$ cc diazoreagens gebracht. Nu werden alle buisjes snel omgeschud en waargenomen in welke buis de eerste verkleuring optrad en ook welke buis het snelst geheel rood werd, met andere woorden waarin de reactie volledig had plaats gevonden. Deze proef werd met andere vertraagd reageerende sera met dezelfde resultaten herhaald.

Het resultaat was steeds, dat in de buis, welke per 10 cc diazo I 0,8 cc nitriet bevatte, de snelst verlopende reactie werd waargenomen. Ook waar het mengsel 0,7 cc bevatte, werd een zeer snelle reactie gezien; toch was 0,8 cc de beste.

De buizen met minder nitriet verkleurden langzamer, doch eindigden tenslotte met goede tint. De buizen met meer nitriet verkleurden langzamer en kregen na eenigen tijd een bruine kleur.

Indien de zoutzuurconcentratie van het diazo I werd veranderd, was het ook steeds de buis welke 0,8 cc nitriet per 10 cc diazo I bevatte, welke de snelste reactie vertoonde althans zoo lang als het zoutzuurgehalte niet daalde beneden 8 op 1000 (zie hoofdstuk IV).

Bij berekening van de hoeveelheid nitriet, die noodig is om alle moleculen sulfanilzuurhydrochloride van 10 cc diazo I te binden, bleek deze overeen te komen met 0,8 cc van een $\frac{1}{2}$ % oplossing

van diazo II. Daar dus het percentage nitriet, gevonden bij deze berekening, geheel overeenkomt met dat hetwelk de snelste reactie in serum opwekt, lag het vermoeden voor de hand, dat de diazoreactie, wat snelheid betreft, afhankelijk is van de hoeveelheid diazoniumverbinding, die de oplossing bevat. Op zich zelf was het waarschijnlijk, dat evenals bij andere chemische reacties de snelheid van de omzetting afhankelijk was van de hoeveelheid der met elkaar reageerende moleculen.

De berekening toont, dat steeds groote hoeveelheden diazonium moleculen in overmaat zijn, zelfs bij sera, welke een betrekkelijk hoog gehalte aan bilirubine bevatten.

Niettegenstaande het feit, dat sera van vol ontwikkelde stuwingsicterus meer bilirubine bevatten, dan sera van dynamische icterus en bij zulke sera dus de overmaat aan diazo-reagens de kleinste is, reageeren zulke sera toch veel sneller dan die der tweede groep. Dit is te danken aan andere omstandigheden dan overmaat van het reagens. Toch is ook bij directe reactie nog versnelling waarneembaar, als men zorgt dat nitriet in aequimoleculaire hoeveelheid met het sulfanilzuur aanwezig is.

Hartog⁸³⁾ berekent de reactieconstante van de diazoreactie op bilirubine, uitgaande van de veronderstelling, dat de diazoreactie monomoleculair zou zijn. Hij meent dit te mogen veronderstellen, daar de overmaat van diazomoleculen zeer groot is en deze niet noemenswaardig zal veranderen, indien een gedeelte gebruikt wordt om aan bilirubine gekoppeld te worden.

Waar echter blijkt, dat bij vergroting van het aantal diazomoleculen de reactiesnelheid toeneemt, meenen wij te moeten betwijfelen of de binding van bilirubine met diazo wel een monomoleculaire reactie in den zin van Hartog genoemd mag worden, althans in serum. Hiervoor heeft dus niet alleen de onderlinge verhouding van diazoniumverbinding en bilirubine beteekenis, maar ook de absolute concentratie der eerste stof.

Ook de uit deze monomoleculaire reactie berekende constante lijkt zoo van haar waarde in te boeten.

Of nitriettoevoeging de diazoreactie versnelt, hangt af van de toegevoegde hoeveelheid. Thannhauser ziet versnelling,

Adler niet, doch deze laatste voegt te veel toe om het optimum der reactie te krijgen.

Uit het voorgaande blijkt dus, dat nitriettoevoeging slechts zoolang versnelt als zij dienen kan om nieuwe diazoverbinding te vormen. Wanneer al het sulfanilzuur uit de vloeistof door het nitriet is verbruikt, werkt een verdere overmaat nitriet slechts vertragend.

Van een specifiek versnellende werking van nitriet, waarover tot nu toe in de literatuur voortdurend wordt meegedeeld, is dus geen sprake.

Samenvattende zien wij, dat vermeerdering der nitriethoeveelheid in het diazoreagens versnellend werkt, tot het in aequimoleculaire hoeveelheid aanwezig is met het zoutzuursulfanilzuur. Als nitriet is het dan in de oplossing niet langer aanwezig, doch gebonden in het diazoniummolecuul. Is in het reagens nitriet in overmaat, dus als zoodanig aanwezig, dan werkt dit remmend op de diazo-reactie. Is er minder toegevoegd dan noodig is om met alle zoutzure sulfanilzuur te koppelen, dan wordt de reactie verlangsamd.

Als voorbeeld kan de volgende proef dienen. Vergelijk vertraagd serum, waarbij de volgende reagentia worden gevoegd:

- a. $1/1000 + 15/1000 + 0,8$ geen overmaat nitriet;
- b. $1/1000 + 15/1000 + 1,2$ overmaat nitriet
- c. $1,5/1000 + 15/1000 + 0,8$ overmaat sulfanilzuur.

Het aantal diazoniummoleculen is in de drie proeven gelijk. Het snelste is de roodkleuring in a, de beide andere zijn langzamer: men ziet dat overmaat nitriet, evenals van sulfanilzuur, de reactie vertraagt. Aequimoleculaire hoeveelheden geven de snelste omzetting.

HOOFDSTUK III

Het sulfanilzuurgehalte van het diazoreagens.

Uit het voorgaande bleek, dat de hoeveelheid diazoverbinding van invloed was op de snelheid van koppeling; het meest komt dit tot uiting bij vertraagde sera.

Tot nu toe verhoogden wij het aantal aanwezige diazoniummoleculen door het nitriet, tot het optimum der werking. Nu was al het sulfanilzuurhydrochloride omgezet in diazoniumverbinding.

Wij kunnen ook het aantal aanwezige diazoniummoleculen vergroeten, door in de oplossing diazo I, waarvan wij uitgaan, in plaats van 1 gr. sulfanilzuur op 1000 cc water, meer sulfanilzuur op te lossen, bijv. 2, 3, 4 gram en hieraan aequimoleculaire hoeveelheden nitriet toe te voegen. Het bleek nu, dat de oorspronkelijk vertraagde reactie van een serum, waarvan wij uitgingen, voortdurend sneller werd hoe meer diazoniummoleculen het reagens, waarmee wij het serum behandelden, bevatte. Een reagens dat bijv. 4 gram sulfanilzuur bevatte met aequimoleculair nitriet, gaf bij toevoeging in een vertraagd reageerend serum een reactie, die veel begon te lijken op een directe. Omgekeerd, indien men het sulfanilzuurgehalte van het diazo I vermindert, en dan aequimoleculaire hoeveelheid nitriet toevoegt, kan men bij direct reageerend serum een reactie verwekken, welke vertraagd is. Beide sera bleken dus in hun reactie-snelheid afhankelijk te zijn van de hoeveelheid toegevoegde diazomoleculen. Het verschil tusschen direct en vertraagd reageerend serum is dus, dat bij direct-reageerend serum een kleine overmaat van diazo voldoende is om een snelle reactie te geven, terwijl bij vertraagd reageerend serum deze overmaat geweldig moet zijn.

Een verschijnsel, dat ook in dit hoofdstuk gememoreerd kan

worden is het volgende: Indien men aan direct of vertraagd reageerend serum $\frac{1}{4}$ volume diazoreagens toevoegt, treedt bij beide, wel is waar na geheel verschillenden tijdsduur, een reactie op, die afloopt.

Indien men echter bijv. $\frac{1}{10}$ volume toevoegt, ziet men, dat bij beide sera de reactie niet meer afloopt, hoewel de berekening toont, dat nog steeds bij beide een groote overmaat diazomoleculen aanwezig moet zijn. Toevoeging van stoffen die de reactie versnellen, bijv. pyridine of natriumbenzoaat, zijn nu niet in staat de omzetting verder te brengen. Pas indien men meer diazoreagens toevoegt, wordt de reactie volledig. Dit vestigt den indruk, dat de in het bloedserum aanwezige proteïnen beginnen met een gedeelte van de toegevoegde diazomoleculen aan zich te binden en deze aan de reactie met het bilirubine te onttrekken.

Indien men een dergelijke proef neemt met een oplossing van natriumbilirubinaat in water, waaraan men bijv. $\frac{1}{50}$ volume diazoreagens toevoegt en daarna hierbij de een of andere stof, bijvoorbeeld pyridine brengt, die in dit milieu een koppeling tot stand kan brengen, ziet men een prompte en aflopende reactie.

In de waterige bilirubinaatoplossing worden blijkbaar geen diazoniummoleculen aan de reactie onttrokken. Worden mogelijk de NH_2 groepen der aminozuren, waaruit de proteïnemoleculen bestaan, gediazoteerd en wordt zodoende de hoeveelheid reagens verminderd?

Een vingerwijzing in deze richting is, dat, indien men serum langen tijd met papayotine samen laat staan, de dan resteerende vloeistof meer diazoreagens gebruikt om volledig te koppelen dan het contrôleserum zonder papayotine. Door dit ferment worden albumosen en polypeptiden gevormd, welke aanmerkelijk meer NH_2 groepen vrij hebben, dan het oorspronkelijke globuline en albumine. Indien wij door dialyse een deel dezer polypeptiden en albumosen verwijderen, wordt de hoeveelheid diazoreagens, noodig om de koppeling van het bilirubine volledig te maken geringer.

Indien wij serum langen tijd dialyseeren tegenover water, wordt de reactie van de binnenvloeistof trager; er is praecipitatie van een deel der eiwitten opgetreden. Meer diazo is nu noodig

om dit serum in reactie te brengen. Een deel van het reagens wordt nu echter gebruikt voor het opnieuw in oplossing brengen der eiwitten, waar het de rol der serumzouten overneemt. Deze waren bij de dialyse voor het grootste deel verdwenen, waardoor er eiwit uitvlokte.

Sulfanilzuur, indien het in overmaat aanwezig is, zoodat het niet gebonden is door het nitriet, heeft een vertragende werking op de bilirubinekoppeling, zooals blijkt uit vergelijking der volgende proeven:

- a. 1 cc serum + 1 cc diazo ($0,25/1000 + 15/1000 + 0,2$).
Het nitriet is aequimoleculair met het sulfanilzuur;
- b. 1 cc serum + 1 cc diazo ($2/1000 + 15/1000 + 0,2$).
Het sulfanilzuur is in overmaat t.o.v. het nitriet aanwezig.

De verkleuring in a komt sneller dan in b, de kleur is beter rood. Overmaat sulfanilzuur geeft een bruine, soms iets blauwe tint.

Om een indruk te geven van het verschil in reactie-snelheid gegeven door oplossingen van diazoreagens, waarin de concentratie der diazoniummoleculen wisselt, werd de volgende proef genomen.

In den comparator van Walpole plaatsten wij aan de eene zijde $\frac{3}{4}$ cc serum (vertraagd) + $\frac{3}{4}$ cc van een reagens, welk mengsel, na geheel te zijn uitgereageerd, werd aangevuld tot 2 cc met physiologische zoutoplossing; achter deze buis stond $\frac{1}{4}$ cc serum aangevuld tot 2 cc met zoutoplossing; aan de andere zijde van den comparator was 1 cc serum bezig te reageeren met 1 cc reagens, achter welke buis 2 cc water stond. Indien de kleur aan beide zijden van den comparator gelijk was geworden, had er dus een omzetting plaats gevonden van $\frac{3}{4}$ van de bilirubine hoeveelheid, welke in 1 cc serum aanwezig was. De tijden noodig om links en rechts kleurgelijkheid te krijgen, werden genoteerd. Wij onderzochten op deze wijze verschillende reagentia, alle ten opzichte van sulfanilzuur en nitriet aequimoleculair samengesteld.

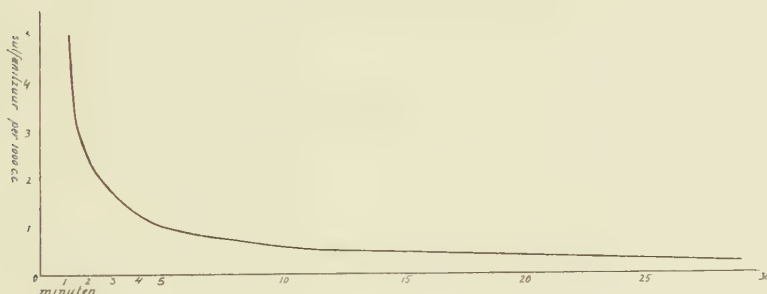
De volgende tabel geeft aan de sterkte der reagentia aan sulfanilzuur en de benodigde tijden om de reactie te volbrengen.

TABEL I

Concentratie sulfanilzuur per liter	Tijd noodig om 75 % van het bilirubine om te zetten
5	70 sec.
4	80 sec.
3	95 sec.
2	2½ minuut
1	5 minuten
½	12 "
¼	29 "

Brengt men deze getallen in curve, met op de ordinaat de sulfanilzuurconcentraties en op de abscis de reactietijden, dan verkrijgt men curve a.

Curve a.



Met het reagens volgens *Hijmans van den Bergh* is de duur 13 minuten, dus iets langer dan met ½ gram sulfanilzuur per 1000 cc. Dit komt uit wat betreft de concentratie aan diazoniummoleculen.

Nu wij hebben vastgesteld, dat ook de hoeveelheid diazomoleculen de reactie-snelheid sterk beïnvloedt, moet er wel op gewezen worden, dat dit van belang is voor de beoordeeling van de resultaten van eenige onderzoekers, die gewerkt hebben met diazo-reagentia, welke, wat het gehalte aan sulfanilzuur betreft, verschillend waren.

Ehrlich gebruikte in zijn eerste mededeeling een verzadig-

de oplossing dezer stof. In een volgende publicatie gebruikt hij 5 gr. sulfanilzuur per liter, weer later 1 gr. sulfanilzuur per liter.

Beide laatste recepten bevatten weinig diazomoleculen, daar de nitriethoeveelheid betrekkelijk gering was. Er was groote overmaat aan sulfanilzuur. H i j m a n s v a n d e n B e r g h ⁹⁶⁻¹⁰²⁾ gebruikte bij zijn onderzoekingen een reagens, dat vrijwel overeenstemt met het laatste door Ehrlich opgegevene. T h a n n h a u s e r e n A n d e r s e n ¹⁹⁵⁾ gebruikten het oorspronkelijke recept van Ehrlich met 5 gr. sulfanilzuur per liter, echter met iets meer nitriet. P e t e r gebruikte hetzelfde reagens. Ook A d l e r e n S t r a u s z ²⁾ e n K e r p p o l a e n L e i k o l a ¹¹³⁾ gebruikten een véél sulfanilzuur bevattend reagens, waarbij nog veel sterk zoutzuur was gevoegd.

De reactiesnelheden die zodoende door verschillende onderzoekers verkregen worden, zullen dus onderling niet goed vergelijkbaar zijn met die, welke gezien zijn door hen die het reagens van H i j m a n s v a n d e n B e r g h gebruikt hebben.

HOOFDSTUK IV

Het zuur van het diazoreagens.

De volgende stof, die besproken zal worden is het zoutzuur. Dit is in overmaat aanwezig, slechts een deel ervan dient voor de vorming van sulfobenzoldiazoniumchloride. De rest geeft aan de vloeistof een HCl-concentratie van ongeveer $\frac{1}{10}$ N overeenkomende met een pH ± 1 ,—, en inderdaad blijkt de pH van het reagens ook ongeveer 1 te zijn.

Indien aan een dergelijk sterk zure oplossing een eiwithoudende vloeistof als bloedserum wordt toegevoegd, zullen in het mengsel verschillende toestandsveranderingen optreden.

Om te beginnen wordt de pH van het serum-diazomengsel een geheel andere door de bufferende eigenschappen van het serum. Welke pH bij menging van diazo en serum verkregen wordt, is afhankelijk van de onderlinge verhouding der beide stoffen. Ook zal het wel eenig verschil maken welk serum gebruikt wordt. Ongeveer is echter de pH als in volgende tabel:

TABEL II

cc diazoreagens	cc serum	pH
1	—	± 1
2	1	1,7
$1\frac{1}{2}$	1	2,—
1	1	3,6
$\frac{1}{2}$	1	4,5
$\frac{1}{4}$	1	5,7
$\frac{1}{2}$	1	6,7
—	1	7,8

Men ziet, dat het een zeer sterk verschil in zuurgraad maakt, of men de diazoreactie uitvoert met $\frac{1}{4}$ volume of met 1 volume reagens op 1 volume serum. Indien dus volgens H ij m a n s van den B e r g h $\frac{1}{4}$ volume reagens gebruikt wordt om de reactie uit te voeren en bijv. volgens L e p e h n e ¹²⁷⁾ of D o d d s ¹⁷⁾ $\frac{4}{5}$ volume, volgens A d l e r en S t r a u s z ²⁾ 1 of $\frac{1}{2}$ volume, zal de pH der verkregen mengsels bij de verschillende onderzoekers niet gelijk zijn, en de vraag rijst of deze omstandigheid van invloed kan zijn op de reactiesnelheid. Volgens lijstje toont de pH aan waarbij voornoemde onderzoekers werkten:

Hijmans van den Bergh	pH 5,7 of 4,5
Lepehne ¹²⁷⁾ , Dodds ¹⁷⁾	4,—
Adler en Strausz ²⁾	3,6 of 4,5
Griffiths en Kaye ⁷⁰⁾	3,4

Een eerste vereischte voor vergelijkbare waarnemingen zijn onderling gelijke omstandigheden. Wat betreft de pH heeft men zich hieraan niet gehouden en eigenlijk deed ieder de reactie zooals het hem het beste uitkwam, met meer of minder reagens, met of zonder verdunning. Behalve dat deze wijze van handelen de pH van het milieu ongelijk doet zijn, is ook het aantal ingebrachte diazomoleculen zodoende niet standvastig. Dat dit een andere uitkomst geeft zagen we in een vorig hoofdstuk.

Dat de zuurgraad van het milieu op de snelheid der diazoteering van invloed is, werd meermalen vastgesteld. Collinson en F o w w e a t h e r ³⁹⁾ meenden dat zoutzuur bij direct serum of gal gevoegd de reactie zou vertragen.

Newman ¹⁵³⁾ deelt mee, dat de toevoeging van zoutzuur de reactie van directe sera vertraagt; alcali versnelt de vertraagde reactie.

R o b e r t s ¹⁶⁸⁾ ziet geen vertraging door zoutzuurtoevoeging aan direct reageerend serum.

W e l t m a n n en H ü c k e l ^{201.202)} vinden, dat zoutzuurtoevoeging de reactie van vertraagde sera langzamer maakt, bij directe sera van niet veel invloed is, misschien iets versnellend werkt.

Griffiths en Kaye^{71,72)} veranderden de pH door alcali-toevoeging aan vertraagd serum; hogere pH gaf versnelling der reactie tot een bepaalde grens. Zoutzuur, toegevoegd aan direct serum, geeft bij pH 1,12 een verlangzaming der reactie.

Davies en Dodds⁴¹⁾ namen de volgende proeven; bij telkens 6 cc direct reageerend serum voegden zij van 1 tot 6 cc diazo-reagens en zagen dat in alle zes proeven de reactie direct was; de pH daalde daarbij van 7,5 tot 2,8.

Dezelfde proeven deden zij met een oplossing van natriumbilirubinaat; de pH daalde na 1 cc reagens reeds tot 1,8; de reactie was negatief. Voegden zij aan de bilirubinaatoplossing bloedalbumine en een fosfaatbuffer toe, dan daalde de pH even langzaam als in serum. Nu is tot en met 4 cc diazoreagens de reactie direct, d.i. tot pH 4,2. Zij meenen, dat het direct blijven der reactie toe te schrijven is aan het niet genoeg dalen der pH. Verder zien zij dat bij een transeudaat de pH na 1 cc diazo toevoegen sterk daalt. De pH is dan laag en de reactie daardoor volgens hen traag.

Nu zou men op grond hiervan verwachten, dat zij deze proeven zouden uitgebreid hebben tot vertraagd reageerend serum, met de bedoeling daarbij aan te toonen, dat de vertraging berustte op te sterke daling der pH door het toegevoegde diazo-reagens, veroorzaakt door een eiwit-tekort, doch zoover gaan zij niet. Men weet trouwens maar al te goed dat in het eiwitgehalte de directe sera zich volstrekt niet van de vertraagde onderscheiden (Jourdain¹⁰⁹⁾, Acel en Goldgrüber¹⁾, Lewin¹⁰⁹⁾, Steinbrücke¹⁸⁷⁾, Fillinski⁵⁵⁾) en hier strandt dus naar onze meening de opvatting van Davies en Dodds omtrent de oorzaak van het mechanisme der directe of vertraagde reactie.

Hunter^{94,95)} zag, dat indien men diazoreagens mengde met een fosfaatbuffer, zoodat de vloeistof pH 6,6 had, men na samenvoegen met elk bilirubine-serum een snelle reactie verkreeg.

Maeda en Morishima⁸³⁾ vonden, dat de snelheid van verloop van de diazoreactie afhangt van de waterstof-ionen-concentratie; hoe hoger de pH was des te langzamer verliep de reactie.

Om een inzicht te verkrijgen, in hoeverre de zoutzuurconcentratie van het diazoreagens van invloed is op de snelheid der azobilirubinevorming werd een reeks proeven gedaan met diazoreagentia, welke stijgende hoeveelheden zoutzuur bevatten, respectievelijk 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20 gr. 25 % zoutzuur per liter.

Nu werden samengevoegd: 1 cc paardenserum + 1 cc physiologische zoutoplossing + 1 cc van deze verschillend zure diazoreagentia. De 0,9 % zoutoplossing voorkwam als een tusschenliggende laag menging van serum en reagens en had als voordeel boven water, geen troebeling met serum te geven. Na menging werd waargenomen, welk reagens de snelst intredende reactie leverde, dus de snelste roodkleuring, en welk reagens het beste een blijvende eindkleur gaf.

Het bleek, dat 8 per duizend zoutzuur de reactie het snelst deed inzetten, doch als eenmaal de maximale koppeling bereikt was, was de kleur niet goed houdbaar. 15 per duizend tot 18 per duizend gaven de meest bestendige eindkleur, doch hadden, om deze te bereiken, meer tijd noodig dan 8 per duizend. Indien meer zuur gebruikt werd, was de azobilirubine kleur iets blauwachtig, 4 en 5 per duizend werden niet volledig rood en gaven een bruine bijtint. Tot en met concentratie 17 per duizend bevatten de mengsels geen vrij zoutzuur tegenover Töpfer's reagens.

Dergelijke proeven werden door ons verder verricht met de bedoeling om de snelheid van omzetting in een getal vast te leggen. Hiervoor werd bepaald de tijd, noodig om 75 % van het in een serum aanwezige bilirubine om te zetten in azokleurstof. In een comparator stonden respectievelijk buis IA en IB en IIA en IIB.

IA bevatte 0,25 cc paardenserum + 1,75 cc physiologische keukenzoutoplossing.

IB bevatte 0,75 cc paardenserum + 0,75 diazoreagens + 0,5 cc physiologische zoutoplossing. Na een tijd staan was de inhoud dezer buis maximaal rood gekleurd.

IIA bevatte 2 cc physiologische keukenzoutoplossing.

II B bevatte 1 cc serum + 1 cc van het onderzochte diazo-reagens.

Aan 10 cc diazo I, welke verschillende hoeveelheden zoutzuur bevatte, werd 0,4 cc diazo II toegevoegd. Bij de proef genomen met paardenserum werd 0,8 cc diazo II gebruikt.

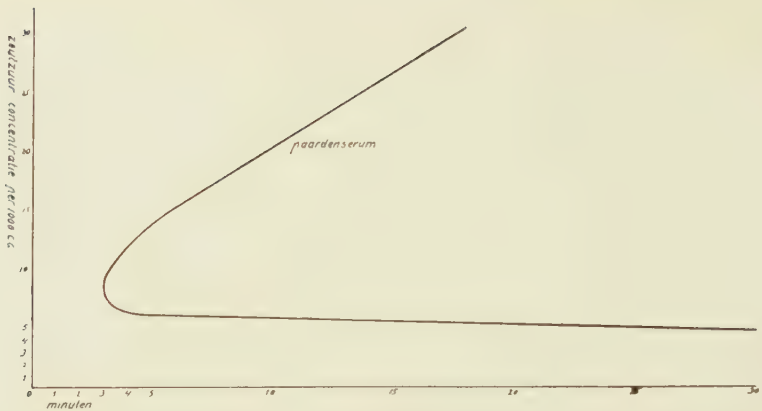
Indien de kleur, gezien door de buizen I A en I B gelijk was aan die gezien door II A en II B, was 75 % van het bilirubine in het serum omgezet.

Bij vertraagd paardenserum werden de volgende resultaten verkregen (zie tabel III). Men ziet in de tabel de zoutzuurconcentratie per liter, de tijd noodig om 75 % van het aanwezige bilirubine in azobilirubine om te zetten en gegevens omtrent de helderheid van de vloeistof.

TABEL III

Zoutzuurconcentratie per 1000 cc	Tijd waarin 75 % van het bilirubine is omgezet	Helderheid
30	18 minuten	iets troebel
20	10 „	
15	5 „	
10	3½ minuut	
8	3 minuten	
6	5½ minuut	
5	25 minuten	
4	zeer lang	

In curve b zijn op de abscis de tijden, noodig om 75 % der gal-kleurstof om te zetten, op de ordinaat de zoutzuurconcentraties per liter afgezet.



Dezelfde meting als met paardenserum werd verricht met serum van een patiënt lijdende aan anaemia perniciosa. Onderstaand ziet men de resultaten van deze metingen. Ook de pH der diverse mengsels is ingevoegd.

TABEL IV

Zoutzuur-concentratie per 1000 cc	Tijd om 75 % van het bilirubine om te zetten	Helderheid	pH
40	32 minuten	helder	1,44
30	20 "	helder	1,67
25	15 "	helder	1,97
20	11½ minuut	helder	2,7
15	7½ "	helder	3,55
12	5 minuten	helder	3,95
11	4 "	helder	4,08
10	3½ minuut	helder	4,28
9	??	troebel	4,49
8	??	troebel	4,85
7	??	troebel	5,32
6	??	iets troebel	5,48
5	20 minuten	helder	5,81
4	zeer langzaam	helder	6,32
3	zeer langzaam	helder	6,6
1	geelachtig	helder	7,35

In curve c zijn op de abscis de tijden noodig om 75 % der gal-kleurstof om te zetten, op de ordinaat de zoutzuurconcentraties per liter afgezet.

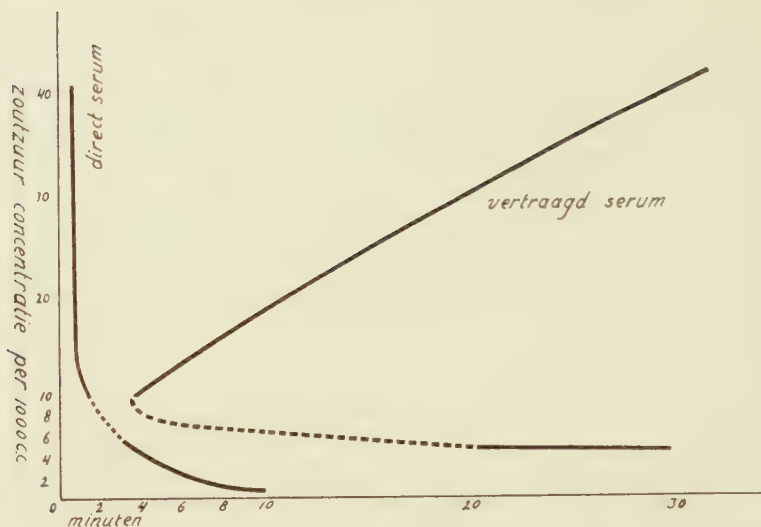
Beide sera bleken dus bij hogere zoutzuurconcentratie langzaam te reageeren. De reactie werd sneller tot 8 per duizend zoutzuur. Nadien trad eenige troebeling op en werd de kleurvorming weer langzamer.

Geheel andere uitkomsten werden echter verkregen, indien men direct reageerend serum voor deze proef gebruikte. Hieronder volgen de verschillende gegevens die hierbij te voorschijn kwamen.

TABEL V

Zoutzuur- concentratie per 1000 cc	Tijd om 75 % van het bilirubine om te zetten	Helderheid	pH
40	45 seconden	helder	1,62
30	30 „	helder	1,82
25	50 „	helder	2,3
20	50 „	helder	2,96
15	45 „	helder	3,96
12	75 „	helder	4,06
11	80 „	helder	4,23
10	90 „	helder	4,45
9	? ?	troebel	4,68
8	? ?	troebel	4,9
7	? ?	troebel	5,22
6	? ?	iets troebel	5,58
5	180 seconden	helder	6,06
4	300 „	helder	6,56
1	440 „	helder	7,45

In curve c zijn op de abscis de tijden, noodig om 75 % der galkeurstof om te zetten, op de ordinaat de zoutzuurconcentratie per liter afgezet.



Bij toenemen der zoutzuurconcentratie blijkt bij direct reageerend serum de reactie niet langzamer te verlopen, althans zoover als de zoutzuurconcentratie door ons kon worden nagegaan. Bij hogere concentratie trad de moeilijkheid op dat de bilirubine zeer snel oxydeerde.

Griffiths en Kaye zien bij hooger en zuurgraad (pH 1.12) de reactie langzaam worden. Door de oxydatie was het ons echter niet mogelijk dit in getallen vast te leggen. Bij vermindering der zoutzuurconcentratie, ongeveer bij 15 per duizend, wordt de reactie trager. Tusschen 10 en 5 per duizend zoutzuur trad een troebeling op, bij nog lagere concentratie verscheen de azobilirubinekleur weer, zij het langzaam.

Indien men dus het reagens hetwelk 15 per duizend zoutzuur bevat als uitgangspunt neemt, ziet men dat bij vertraagde sera extra zoutzuurtoevoeging de reactie verlangzaamt, bij directe sera blijft daarbij de snelheid van koppeling ongeveer constant. Vermindert men de zuurconcentratie, dan worden vertraagde sera eerst sneller, daarna langzamer; direct reageerend serum wordt langzamer.

Nog werd de volgende proef genomen om vast te stellen in hoeverre de H-ionenconcentratie van invloed is op de reactiesnelheid. In een reeks buisjes werd $\frac{1}{2}$ cc diazoreagens gedaan, waaraan stijgende dosis verdunde natronloog werden toege-

voegd en water tot constant volume. Na menging werd in elke buis 1 cc paardenserum gebracht. Het bleek nu, dat de buizen, waarin de pH 4,9 tot 5,5 was, het snelste koppelden, met een maximum ongeveer op pH 5,2.

Hier kregen we dus weer een dergelijke uitkomst als bij de voorgaande proeven. Bij hogere en lagere pH was de koppeling minder snel. We maken hierbij nog opmerkzaam, dat bij vertraagde sera de snelste reacties toch niet direct en prompt was.

Uit voorgaande proeven blijkt dus een duidelijk verschil in gedrag van direct en vertraagd reageerend serum. Ook met natriumcarbonaat, kaliumcarbonaat en natriumhydrocarbonaat konden wij versnelling der reactie verkrijgen.

Het valt ons op dat direct reageerend serum in staat is bij pH 7 azokleurstof te vormen, vertraagd reageerend bilirubine is hier niet of slechts in zeer geringe mate toe in staat.

Bij onze voorgaande proeven werd dus de pH van het mengsel veranderd door loog of zuur toe te voegen. Wij zouden dit, evenals Davies en Dodds, Hunter ook kunnen doen door van buffers gebruik te maken, bijv. zooals zij van een fosphaatbuffer. Zij hadden gezien dat deze de diazoreactie direct maakt, althans sterk versnelt.

Een andere stof die volgens de literatuur ook een versnellende werking heeft op de diazoteering is benzoas natricus c. coffeino, welks invloed Adler en Strausz ontdekten. Zij schreven dit toe aan een ontzwellende werking op de eiwitten (zie bladz. 66.)

Lepehne, Enriques en Sivo⁴⁹⁾, Jendrassik en Czike¹⁰⁵⁾ bevestigen de versnellende werking. Weltmann en Hückel²⁰¹⁾ stelden vast, dat zij te danken was aan het natrium benzoicum, de coffeïnecomponent was van geen invloed. Zij ontkennen dat een ontzwellende werking op eiwitten iets met de reactie uitstaande heeft, opperen veeleer de mogelijkheid dat de werking te danken is aan de omstandigheid dat deze stof, een zout van een zwak zuur, buffereigenschappen heeft. Ook salicylas natricus versnelt volgens hen de reactie eenigszins. Nadere argumenten voor deze verklaringswijze brengen zij niet naar voren.

Wij konden ons van de versnellende werking van benzoas natricus en salicylas natricus geheel overtuigen. De reactie van vertraagd serum kon hiermede maximaal direct worden gemaakt. Onmiddellijk bleek, dat andere zouten van zwakke zuren eveneens een versnellende werking hebben. Onderzocht werden de zouten van:

mierenzuur,	melkzuur,	wijnsteenzuur,
azijnzuur,	valeriaanzuur,	salicylzuur,
boterzuur,	barbituurzuur,	phosphorzuur
citroenzuur,	oxaalzuur,	(secundair).

Van azijnzuur werd het natrium, kalium, lood, zink en kwikzout onderzocht; alle bleken een versnellende werking te hebben.

Hijmans van den Bergh en Muller zagen, dat de diazoteering van een waterige bilirubinaatoplossing versneld werd door natronloog, natriumzouten van galzuren en het natriumzout van citroenzuur.

De versnellende werking op de diazoreactie van novasurol, welke Adler en Strausz opmerkten, konden wij geheel bevestigen; ook salyrgan bleek deze eigenschap te hebben. Deze stoffen zijn acetaten, wat hun werking verklaart. bevestigen; ook salyrgan bleek deze eigenschap te hebben. Deze stoffen zijn acetaten, wat hun werking verklaart.

Calcium-diuretine (salicylas calcicus c. theobromate calcico) versnelt sterk, is dan ook een salicylaat.

Daar al deze stoffen een bufferende werking bezitten, was het verleidelijk de meening van Weltmann en Hückel over te nemen. Om deze op hare juistheid te toetsen werd een reeks proeven gedaan met natriumacetaat en natriumbenzoaat als prototypen.

Aan $\frac{1}{2}$ cc diazoreagens werd 2 cc der zoutoplossing van bekende sterkte toegevoegd en nu vervolgens met 1 cc vertraagd serum gemengd. Er werd waargenomen of de reactie direct werd en bij welke pH dit plaats vond.

TABEL VI

Concentratie benzoaat	pH	Snelheid
	7,28	traag
	6,85	direct
25 %	6,36	"
6 %	5,69	minder direct
2 %	5,17	langzaam
1 %	5,07	zeer langzaam
$\frac{3}{5}$ %	4,85	negatief

Normaal serum dat weinig bilirubine bevat.

TABEL VII

Concentratie acetaat	pH	Snelheid
70 %	6,89	direct
35 %	6,54	"
$17\frac{1}{2}$ %	6,25	bijna direct
7 %	5,92	langzaam
$3\frac{1}{2}$ %	5,78	langzaam
$1\frac{3}{4}$ %	5,48	zeer langzaam
0 %	4,55	negatief

Normaal serum dat weinig bilirubine bevat.

TABEL VIII

Concentratie acetaat	pH	Snelheid
70 %	6,74	direct
60 %	6,61	"
48 %	6,56	"
40 %	6,45	"
30 %	6,39	"
20 %	6,21	bijna direct
15 %	6,2	" "
10 %	5,95	" "
5 %	5,79	minder snel
$2\frac{1}{2}$ %	5,55	" "
1 %	5,18	langzaam
0 %	4,52	zeer langzaam

Normaal serum waarin natriumbilirubinaat is opgelost.

TABEL IX

Concentratie benzoaat	pH	Snelheid
	7,28	vrij snel
25 %	6,55	direct
13 %	5,95	"
6 %	5,6	vrij snel
3 %	5,37	traag
1½ %	5,05	negatief

Normaal serum waarin natriumbilirubinaat is opgelost.

TABEL X

Concentratie acetaat	pH	Snelheid
70 %	6,89	direct
35 %	6,55	"
18 %	6,26	bijna direct
7 %	5,95	idem
4 %	5,67	langzaam, spoor
2 %	5,5	" "
0 %	4,5	negatief

Normaal serum waarin natriumbilirubinaat is opgelost.

TABEL XI

Concentratie acetaat	pH	Snelheid
80 %	6,76	direct
70 %	6,69	"
60 %	6,64	"
52 %	6,52	"
40 %	6,47	"
30 %	6,38	"
20 %	6,20	bijna direct
15 %	6,10	" "
10 %	6,00	" "
5 %	5,75	minder snel
4 %	5,64	" "
2½ %	5,50	" "
0 %	4,30	zeer langzaam, negatief

Paardenserum

TABEL XII

Concentratie benzoaat	pH	Snelheid
	7,11	zeer langzaam
25 %	6,15	direct
19 %	5,85	"
12½ %	5,72	"
6 %	5,65	iets minder direct
3 %	5,35	minder direct
1½ %	5,1	langzaam
1 %	5,06	negatief spoor?
0 %	4,7	negatief

Paardenserum

TABEL XIII

Concentratie acetaat	pH	Snelheid
70 %	6,68	direct
60 %	6,62	"
48 %	6,48	"
40 %	6,42	"
30 %	6,36	"
20 %	6,19	bijna direct
15 %	6,07	" "
10 %	6,00	" "
5 %	5,71	minder snel
2½ %	5,53	" "
1 %	5,19	langzaam
0 %	4,52	zeer langzaam

Serum patient icterus haemolyticus.

Zooals uit de tabellen blijkt vindt bij vertraagd serum een directe reactie plaats bij een pH, die veel hooger ligt dan die welke wij bij de vorige methodiek als de snelste verkregen. Wij hebben gedacht aan den invloed van de groote hoeveelheid zout die, in tegenstelling met de eerste methode, bij de tweede in de vloeistof wordt gebracht. Behalve de H-ionenconcentratie zouden dan ook de zouten voor de snelheid der diazoteering een rol kunnen spelen. De juistheid hiervan bleek uit een orienteerende proef.

Bij twee buizen, welke ieder 1 cc vertraagd serum bevatten, werd in de eerste 1 cc water gebracht, in de tweede 1 cc N keukenzoutoplossing; vervolgens werd aan beide $\frac{1}{4}$ cc diazo toegevoegd. Het bleek nu dat de buis, waarin zout was gebracht, sneller koppelde dan de andere. De pH was in beide buizen gelijk, een aanwijzing dus, dat de zouthoeveelheid invloed op de reactiesnelheid uitoefent. Wij komen hierop in een hoofdstuk over den invloed der zouten nader terug.

Wij deden dezelfde proeven als hiervoor met serum werden beschreven, met een waterige oplossing van natriumbilirubinaat, welke vervaardigd werd door bilirubine „Homburg” op te lossen in eenige druppels 1_{10} N natronloog en verder met water te verdunnen. Er werd zorg gedragen, dat de zuurgraad der oplossing boven pH 7,— bleef.

A. pH verandering zonder buffer.

Aan een rij buizen, die $\frac{1}{2}$ cc diazo bevatten, werd stijgend verdunde loog toegevoegd en vervolgens water tot gelijk volume. Dan werden alle buizen met 1 cc bilirubinaat bedeed en de reactiewijze genoteerd. De resultaten ziet men in onderstaande tabel.

TABEL XIV

Snelheid der reactie	pH	
negatief	2,55	
negatief	2,8	
spoor	3,15	
direct	3,7	bijna totaal, kleur blijft lang
„	3,8	„ „ „ „ „
„	4,4	„ „ „ „ „ niet lang
„	5,2	na korten tijd kleur weg, dan bruingeel
„	5,4	„ „ „ „ „ „
„	5,8	dadelijk „ „ „ „ „
„	6,2	„ „ „ „ „
„	7	„ „ „ „ „
„	8,12	„ „ „ „ „
„	10,2	paarsrood, blijft vrij lang

Bij betrekkelijk lagen zuurgraad pH 3,7 treedt directe reactie op. Tot pH 8,12 is de reactie direct, al is de ontstane kleur niet bestendig. Bij lagere pH gaat de reactie zéér langzaam voort.

Men kan ook een natriumbilirubinaatoplossing laten reageeren door het reagens sterk (bijv. 200 maal) te verdunnen, of uit te gaan van reagens, dat zeer weinig zoutzuur bevat.

B. pH verandering met buffer.

Diazo werd met acetaat of benzoaatoplossing gemengd en hierbij werd 1 cc bilirubinaatoplossing gevoegd. Onderstaande tabellen verduidelijken de resultaten bij deze proeven verkregen.

TABEL XV

Concentratie acetaat	pH	Snelheid
70 %	6,85	direct
35 %	6,5	"
18 %	5,95	minder direct
9 %	5,85	" "
6 %	5,61	" "
5 %	5,35	langzaam
2½ %	4,98	negatief

Indien meer acetaat gebruikt werd:

6,96	direct	} roode kleur verdwijnt gaat in geel over
7,26	"	
7,51	"	

Bilirubinaatoplossing met acetaat

TABEL XVI

Concentratie benzoaat	pH	Snelheid
25 %	6,31	direct
22 %	6,21	"
19 %	6,07	"
16 %	5,99	"
12½ %	5,89	"
10 %	5,88	"
6½ %	5,77	iets trager, doch haast direct
5 %	5,52	" " " " "
4½ %	5,47	" " " " "
3¾ %	5,4	" " " " "
3½ %	5,32	trager
3 %	5,31	"
2½ %	5,23	"
2 %	5,01	langzaam
1¼ %	4,96	zéér langzaam
½ %	4,09	" "

Bilirubinaatoplossing met benzoaat.

Men ziet dat bij hooge pH de reactie snel is en de kleur bestendig. Bij de lagere pH treedt zéér langzaam of geen reactie op. Bij pH 5,— is geen reactie meer aanwezig.

Bij een volgende proef werd aan 1 cc van een bufferoplossing 1 druppel diazoreagens toegevoegd en vervolgens 1 cc bilirubinaatoplossing.

TABEL XVII

pH buffer	Azobilirubine na eenige seconden	Azobilirubine na 10 uur	Neerslag bilirubine
4,5	negatief	negatief	++++
5	"	spoor ?	++++
5,5	"	spoor	++++
6,—	"	geheel	+++
6,1	iets	} kleur blijft	+++
6,2	meer		++
6,4	direct geheel ?		+ ?
7	direct		—
7,5	"		—
8,—	"		—
8,4	"	"	—

Men ziet uit de tabel dat de reactie direct is van alcalisch tot op pH 6,4; daaronder is de koppeling langzamer. Ook hier wordt weer de indruk gevestigd, dat de zoutconcentratie bij de gebufterde proeven van invloed is op de snelheid der koppeling.

Om na te gaan of de pH, waarbij bilirubine uit de oplossing wordt neergeslagen, dezelfde is als die waarbij de azobilirubinevorming vermindert, werden een reeks proeven verricht.

Aan eenige buizen, die ieder $\frac{1}{2}$ cc diazo A bevatten, werd stijgend verdunde natronloog toegevoegd en vervolgens water tot gelijk volume; daarna werd in iedere buis 1 cc bilirubinaatoplossing gebracht. Na mengen werden de buizen 10 minuten gecentrifugeerd en nagegaan bij welke pH een neerslag optrad. In volgende tabel is een en ander te zien.

TABEL XVIII

pH	Neerslag bilirubine
2	++++
3,5	++++
3,98	++++
5,9	+++
6,1	+++
6,2	++
6,35	+ ?
6,4	—
6,6	—
7,2	—

Vervolgens werd in een rij buisjes, die 1 cc bufferoplossing van stijgende pH bevatten, een druppel diazoreagens gebracht. Na menging wordt aan alle buizen $\frac{1}{2}$ cc bilirubinaat toegevoegd en daarna 10 minuten gecentrifugeerd. De uitkomsten zijn in tabel XVII, 4e kolom, neergelegd. Tot pH 6,4 bleef bilirubinaat in oplossing. Hieronder ontstond een met dalende pH toenemende troebeling van bilirubine.

In deze laatste proef bestaat een duidelijk parallelisme tus-

schen het afnemen der directe reactie en het toenemen van de troebeling. Het ligt voor de hand de verklaring van dit parallelisme daarin te zoeken, dat in het pH overgangsgebied de gedeeltelijk neergeslagen bilirubine niet meer, de nog in oplossing zijnde bilirubine nog wel reageert. Zonder het gebruik van buffer zou de bilirubine nog zoo lang opgelost zijn om met het diazoreagens te koppelen tot ongeveer pH 3,7. Met het gebruik van buffers zou het bilirubine door de groote zoutconcentratie uitgezouten worden en zoo terstond uit de oplossing zijn.

Deze beschouwing omtrent het verband der directe reactie en al of niet neerslaan van bilirubine zijn door ons slechts uitgewerkt voor waterige oplossing van bilirubinaat. Voor het natuurlijke bilirubine in serum zijn nog andere factoren in het spel, waarop wij later terugkomen.

Door voorgaande proeven wordt ook de door Muller en Hijmans van den Berg⁹⁷⁻⁹⁹) gevonden versnellende werking van galzure zouten op de diazoteering van bilirubinaatoplossing verklaard. Dit zijn zouten van zwakke zuren; zij zullen, in voldoende hoeveelheid ingebracht, de pH van het mengsel zóó maken, dat een versnelde reactie optreedt. Wij konden hun waarneming bevestigen. Ook natronloog en citraat, door hen aangegeven, vinden in pH werking hun verklaring.

Omtrent de versnellende werking van alcohol opperden Weltmann en Hückel een theorie waarbij zij meenden dat alcohol een soort bufferende werking zou uitoefenen. Zij kwamen hiertoe, doordat zij zagen dat, indien men aan water of aan een zelfde hoeveelheid alcohol een even groot volume zoutzuur toevoegt, een indicator als congorood zich in de waterige vloeistof rood kleurt, in de alcoholische nog niet. Hieruit leiden zij af, dat alcohol den dissociatiegraad van het zoutzuur terugdringt. Indien deze redeneering juist is, zou de snelle diazoteering, die alcohol te voorschijn roept, haar verklaring vinden in de terugdringing van den dissociatiegraad van het zoutzuur van het diazoreagens. Eenige proeven door ons verricht om deze theorie te toetsen, konden de juistheid ervan niet bevestigen.

Aan een alcoholisch filtraat van vertraagd serum werd water toegevoegd en de pH bepaald. Het bleek, dat de reactiesnelheid

afhankelijk was van de alcoholconcentratie en niet van de pH, zooals uit onderstaande tabel blijkt:

								pH	reactiesnelheid			
$\frac{1}{2}$	cc	filtraat	+	$1\frac{1}{2}$	cc	water	+	$\frac{1}{2}$	cc	diazo	1,65	langzaam
1	cc	„	+	1	cc	„	+	$\frac{1}{2}$	cc	„	1,63	vrij snel
$1\frac{1}{2}$	cc	„	+	$\frac{1}{2}$	cc	„	+	$\frac{1}{2}$	cc	„	1,66	zeer snel

Men ziet, dat bij gelijk blijvende pH een méér aan alcohol de reactiesnelheid sterk doet toenemen. Met een oplossing van bilirubinaat is hetzelfde waar te nemen.

					pH	reactiesnelheid						
1 cc	bilirubinaat	+	$\frac{1}{2}$ cc	alcohol	+	$\frac{1}{2}$ cc	water	+	$\frac{1}{2}$ cc	diazo	1,88	zéér langzaam
1 cc	„	+	1 cc	„	+	$\frac{1}{2}$ cc	„	1,81	vlug			
1 cc	„	+	1 cc	„	+	$\frac{1}{2}$ cc	„	1,92	zéér vlug			

De proef met het congorood van Weltmann en Hückel is volgens B. Rasmussen¹⁶³⁾ op andere wijze te verklaren: in alcohol is dezelfde dissociatiegraad van het zuur als in water aanwezig; het omslagpunt der indicatoren ligt echter op een andere plaats dan in waterige oplossing. Met den indicator azo-bilirubine komt dit ook tot uiting, wat als volgt is te zien.

In twee buizen doet men 1 cc van een alcoholische azobilirubine-oplossing en voegt aan de een 1 cc water toe, aan de ander 1 cc alcohol. De buis met water aangevuld is blauwachtig: pH 2,03, de buis met alcohol aangevuld is roodachtig: pH 2,01. Ook hier is bij gelijke pH een sterk kleurverschil te zien. Indien aan de roode alcohol bevattende buis water werd toegevoegd, werd de kleur meer blauwachtig, na alcohol meer rood, enz. De verklaring van Weltmann en Hückel omtrent de versnellende werking van alcohol kan dan ook niet de juiste zijn. O. i. moet de versnellende werking van aethylalcohol, methylalcohol (Hijmans van den Bergh), aceton (Lepehne), ijs-azijn (Kerppola), propylalcohol (Kerppola en Leikola) toegeschreven worden aan de eigenschap, die deze stoffen bezitten om bilirubine op te lossen. Deze oplossingen kunnen dan met het waterige diazoreagens een homogeen mengsel vormen, waarin de diazoreactie zich voltrekt, eventueel in zeer sterk zuur

milieu (ijs-azijn), waarbij een blauw azobilirubine ontstaat. Genoemde stoffen zijn allen oplosmiddelen voor azobilirubine (ijs-azijn: May, Martindale en Boyd¹³⁶)). De door ons gevonden versnellende werking van pyridine zou ook onder deze verklaring te vatten zijn.

Het viel ons op, dat al deze stoffen: alcoholen, aceton, ijs-azijn, water onttrekkende middelen zijn. Men zou zich kunnen voorstellen, dat de versnellende werking dezer stoffen berust op het onttrekken van een of meer moleculen water aan het bilirubine-molecuul, welke aldus gevormde stof een directe reactie zou hebben. Deze omzetting zou dan in zooverre reversibel zijn, dat indien men de alcoholconcentratie verlaagde, de reactie weer vertraagd werd, hetwelk door ons werd waargenomen (zie bladz. 74).

Om deze veronderstelling te toetsen behandelden wij een bilirubinaatoplossing met sterk wateronttrekkende stoffen, als natriumsulfaat exsic., phosphorpentoxyd.

Wij wreven de bilirubinaat met deze stoffen af tot een half vaste massa ontstond. Hierbij werd diazoreagens gevoegd en nagegaan of een directe reactie optrad. Dit was in het geheel niet het geval. Het azobilirubine ontstond zeer langzaam, reden waarom wij de laatste veronderstelling verwierpen. De proef gaf ook geen positief resultaat, indien het bilirubinaat en het diazoreagens na menging met de water onttrekkende stoffen werden behandeld.

HOOFDSTUK V

Het water bij de diazoreactie.

Zooals wij zagen verdunt H i j m a n s v a n d e n B e r g h 1 cc serum met 1 cc (of meer) water, en voegt hier $\frac{1}{4}$ tot $\frac{1}{2}$ cc reagens aan toe; hij neemt waar of in hoogstens 30 seconden een tintverandering optreedt. Wat de bedoeling is van dit verdunnen met water deelt hij niet mee. Latere schrijvers, bijv. L e p e h n e, D o d d s, A d l e r e n S t r a u s z laten deze verdunning achterwege, op welken grond wordt echter niet nader besproken.

Als men sera met gelijk volumen water verdunt, ziet men nu en dan een lichte troebeling optreden, veroorzaakt door eiwitten. Indien men het verdunnen met water wenscht te handhaven, aangezien dit nu eenmaal de in de literatuur bekende standaardmethode is, lijkt het practischer dit niet met water te doen, doch met physiologische zoutoplossing; er treedt dan geen troebeling op, de buizen blijven helder en zodoende is haar kleur beter vergelijkbaar.

Verder verdeelt men door verdunnen de hoeveelheid bilirubine die zich in 1 cc serum bevindt over 2 cc. Hetzelfde is het geval met het diazoreagens; ook dit wordt sterker verdund. Wij hebben gezien, dat de concentratie der diazo-oplossing van grooten invloed is op de snelheid der reactie: dat meer moleculen van het diazo sneller reacties verwekken. Wij mogen dan ook aannemen, dat de reactie, verricht volgens de oorspronkelijke methode van H i j m a n s v a n d e n B e r g h, langzamer zal verlopen dan die, waarbij verdunning met water achterwege gelaten wordt. Men kan dit gemakkelijk waarnemen door het volgende proefje: met 1 cc serum mengt men 1 cc water en $\frac{1}{2}$ cc

diazoreagens; met een tweede cc serum alléén een $\frac{1}{2}$ cc reagens. Na een zekere inwerkingstijd vult men het 2e buisje met water aan tot hetzelfde volumen als de contrôlebuis; men ziet nu, dat het buisje waaraan oorspronkelijk geen water was toegevoegd, meer rood gekleurd is dan het andere. Wij moeten er daarop op wijzen, dat iedere methode, die afwijkt van de oorspronkelijke van H ij - m a n s v a n d e n B e r g h, bij de interpretatie van hare resultaten andere eischen stelt dan deze. Dit geldt met name voor den tijd van inwerking, na welken men een roodkleuring voor een positieve directe reactie verklaart. Verdunt men van te voren niet met water, dan zal men dezen tijd korter kunnen nemen dan bij de oorspronkelijk aangegeven reactie.

HOOFDSTUK VI

De rol der zouten bij de diazoreactie.

In een vorig hoofdstuk werd de rol van het zoutzuur bij de diazoreactie behandeld. Wij zagen, dat het een duidelijk verschil maakt of de pH veranderd wordt door zuur en alcalitoevoeging of door buffers, en dit verschil (tusschen de beide methoden) bleek te berusten op de groote hoeveelheden zout, die door de buffers in het serum-diazomengsel werden gebracht. De zuurgraad, waarbij volgens beide methoden de snelste diazoreactie verkregen werd, was niet dezelfde. Indien de pH slechts door zuur of alcali toevoeging veranderd werd, lag de snelste reactie bij pH 5,2, maar bereikte de snelheid ook dan nog niet die der „directe” reactie; wordt de pH gevarieerd met behulp van buffers, dan was een prompte reactie te verkrijgen bij pH 7 tot pH 5,5. Ter verklaring hiervan hebben wij toen reeds gewezen op de omstandigheid, dat in het tweede geval in de vloeistof veel zout aanwezig was. De vraag kwam toen bij ons op of het noodzakelijk is dat dit zout een bufferzout is of dat ook eenvoudige niet bufferende zouten van sterke zuren en sterke basen voor dit doel werkzaam zijn. Voor NaCl toonden wij dit voorloopig aan in het vorige hoofdstuk. Deze vraag valt te meer in de lijn van ons onderzoek, omdat immers in het diazoreagens ook een weinig NaCl aanwezig is en wij dus streng genomen bij dit onderzoek omtrent den invloed der bestanddeelen van het reagens dit keukenzout niet mochten verwaarloosen. Indien men nagaat wat in de literatuur bekend is over de werking van zouten op de snelheid der diazoreactie, is de oogst gering. Slechts Adler en Strausz²⁾ hebben deze kwestie in hun uitvoerig onderzoek aangeroerd. Zij schrijven aan de zwellende en ontzwellende werking der electro-

lyten uit de rij van Hofmeister respectievelijk een vertragende of versnellende werking toe. Rhodanide, jodide, bromide, nitraat, chloride van natrium en kalium vertragen volgens hen de diazoreactie; tartraat, citraat, acetaat, fosphaat van natrium versnellen. Sulfaat versnelt niet, heeft een licht vertragende werking, wat met hun redeneeringen niet rijmde.

Zooals in hoofdstuk IV werd meegedeeld zijn tartraat, citraat, acetaat en fosphaat zeer sterk versnellende stoffen voor de diazoteering; er werd op gewezen, dat hiervoor hun bufferende werking een rol speelde.

In hun proeven gebruikten Adler en Strausz steeds een „weinig” of een „spoor” der zouten; de hoeveelheid is dus niet nauwkeurig na te gaan. Zij werkten meest met een serum-diazomengsel ($\frac{1}{2}$ cc serum + $\frac{1}{4}$ cc diazo), hetwelk, naar wij schatten, ongeveer pH 4,5 zal hebben gehad.

Wij konden hun opgaven geenszins bevestigen.

Indien wij een mengsel namen van 1 cc vertraagd serum + 1 cc N-zoutoplossing + 0,4 cc diazoreagens bleek een versnelling der diazoteering in deze volgende volgorde af te nemen. Rhodanide sneller dan jodide, sneller dan nitraat, sneller dan bromide, sneller dan chloride, sneller dan fluoride, sneller dan sulfaat, sneller dan contrôle zonder zout:

CNS > J > NO₃ > Br > Cl > Fl > SO₄ > contrôle,

acetaat en fosphaat reageerden sneller dan hun plaats in de lyotropereeks (Hofmeister) aangaf.

Indien wij een mengsel maakten van 1 cc serum + 1 cc 1 2000 N zout + 0,4 cc diazo bleek de versnelling als volgt te zijn:

CNS > J > NO₃ > Br > Cl > Fl > acetaat > fosphaat >
sulfaat > contrôle

De versnellende werking van salicylaat en benzoaat bleek nog sterker dan van KCNS en acetaat. Aan 1 cc serum werd 0,05 cc N oplossing dezer zouten toegevoegd en vervolgens na menging 0,2 cc diazo. De mengsels hadden ongeveer pH 6,4; de snelste was salicylaat, dan benzoaat, dan rhodanide, dan acetaat.

Indien de concentratie der zouten nog lager werd genomen, namelijk 1/100000 in het mengsel, bleef de volgorde der reeks dezelfde. Hoe minder zout werd toegevoegd, hoe minder de versnelling was, doch de onderlinge verhouding ten opzichte van de contrôle, waaraan geen zoutoplossing doch gedistilleerd water was toegevoegd, bleef gelijk. Acetaat en fosphaat volgden in lage concentratie de lyotrope reeks, in hoogere concentraties niet. De pH van het mengsel was dan veel hoger en daardoor de reactie sneller.

Toen wij vaststelden, dat de versnellende werking der electrolyten de lyotrope reeks volgde, hielden wij nog geen rekening met de pH der vloeistof en de vraag kwam bij ons op, welken invloed deze factor op de volgorde in de reeks zou hebben. Wij deden deze proeven met betrekkelijk hoge en betrekkelijk lage zoutconcentraties. Bij hoge concentratie der zouten in het mengsel (eindnormaliteit 0,33—0,55 N) was het volgende waar te nemen:

pH 6.-	CNS > J > NO ₃ > Br > Cl > SO ₄ > contrôle
4.4	CNS > J > NO ₃ > Br < Cl < SO ₄ < contrôle
3.2	CNS > J > NO ₃ > Br < Cl < SO ₄ < contrôle
2	CNS > J > NO ₃ > Br < Cl < SO ₄ < contrôle
1.75	CNS > J > NO ₃ > Br < Cl < SO ₄ < contrôle

Zooals men ziet vond tusschen pH 6 en pH 4,4 een omkeering in de volgorde plaats, zoodat Cl en SO₄ vertragend beginnen te werken. De omkeering zal in de buurt van pH 4,4 plaats vinden. Adler en Strausz hebben hun proeven in de buurt van pH 4,5 verricht en vonden eveneens, dat chloride vertraagde, maar stelden in tegenstelling met ons vast dat rhodanide, jodide, nitraat en bromide ook vertragen. Wij verwijzen hierbij nog naar wat wij tevoren opmerkten omtrent de onnauwkeurige zoutdoseering van Adler en Strausz.

Bij lage concentratie der electrolyten in het mengsel (eindnormaliteit 0,042—0,024 N) werden de onderstaande uitkomsten genoteerd:

pH $\pm$ 6.1	CNS > J > NO ₃ > Br > Cl > SO ₄ > contrôle
$\pm$ 4.4	CNS > J > NO ₃ > Br < Cl < SO ₄ < contrôle
$\pm$ 3	CNS > J > NO ₃ < Br < Cl < SO ₄ < contrôle
$\pm$ 2	CNS > J > NO ₃ < Br < Cl < SO ₄ < contrôle
1.7	CNS > J > NO ₃ > Br < Cl < SO ₄ < contrôle

Zooals men ziet is hier ook een omkeering der volgorde van de lyotrope reeks tusschen pH 6,1 en 4,4 en wel op een iets vroegere plaats dan bij de vorige proef. Alle verschillen zijn hier echter veel minder overtuigend door de geringe concentratie der zouten.

Een dergelijke versnellende werking als bij vertraagde sera werd door ons ook waargenomen met direct reageerende sera. Deze werden ook versneld in volgorde van de rij van Hofmeister. Men kan dit zichtbaar maken door weinig reagens te gebruiken, bijv. 1 cc serum — 0,2 cc reagens; de reactie is na zout toevoegen duidelijk versneld t.o.v. een contrôle zonder zout.

Ook kan men gebruik maken van een reagens, dat weinig diazomoleculen bevat, waardoor de reactie traag wordt (zie hoofdstuk II en III).

Bij onze proefnemingen scheen het, dat de versnellende werking van een zout een optimum heeft bij een bepaalde pH; wij gingen na of dit bij de neutrale zouten het geval was.

Aan een reeks buizen met ieder 1 cc diazo — 1 cc N electrolytoplossing werd stijgende dosis natronloog toegevoegd en water tot constant volumen. Na menging werd in iedere buis 1 cc vertraagd serum gebracht en genoteerd, bij welke pH de reactie het snelst verliep. Hier volgen de uitkomsten met de verschillende zouten verkregen.

De snelste reactie had ongeveer op de aangegeven pH plaats:

NaCNS	pH 6,4
NaJ	„ 6,15
NaNO ₃	„ 5,9
NaBr	„ 5,7
NaCl	„ 5,5
Na ₂ SO ₄	„ 5,5
Contrôle	„ 5,2

Men ziet uit deze reeks, dat elk zout zijn eigen optimum pH heeft voor de diazoteeringssnelheid en dat de volgorde dezer optimum pH's wederom die der lyotrope reeks is.

Indien men in plaats van met serum de werking der lyotrope reeks nagaat bij een oplossing van natriumbilirubinaat in water ziet men alleen een versnellende werking van fosphaat en acetaat (beiden bufferen). Echter moet hierbij opgemerkt worden, dat in dit milieu de pH dermate laag is, dat een reactie ook niet tot uiting kan komen door neerslaan van het bilirubine. Wordt de pH hoger gekozen, dan treedt makkelijk spontane diazoteering op. Toch meenen we enkele aanwijzingen te bezitten dat CNS versnelt, Cl vertraagt. Wij konden deze proeven niet verder vervolgen, doch mogelijk zullen hier ook dergelijke effecten aan den dag komen.

Nog willen we eenige feiten vermelden, die wij waarnamen aan een mengsel van natriumbilirubinaat en meer of minder verdund kippeneiwit. Hierbij treedt de lyotrope reeks in versnellenden zin duidelijk naar voren, en bleek bij een bepaalde pH een optimale werking der zouten, afhankelijk van de hoeveelheid toegevoegd eiwit te bestaan. Bij de laagste concentratie van kippeneiwit reageerde CNS van pH 6,5—8 het snelst, de kleur ging echter dadelijk weg en werd dan geel. Bij pH 5,7 bleef de kleur bestaan. Voor SO_4 was de snelste reactie bij pH 5,7. Indien iets meer eiwit werd toegevoegd, was voor CNS de reactie van pH 6,5—8 het snelst, de kleur ging dadelijk weer weg en werd dan geel, maar zij bleef bij pH 6,3 bestaan. Voor SO_4 was de snelste reactie bij pH 6,—.

Het is hier de plaats om te vermelden, dat een oplossing van bilirubinaat gemengd met kippeneiwit nog andere eigenaardigheden vertoont, afhankelijk van de hoeveelheid eiwit in de oplossing.

Eiwit $\pm$ 15 maal verdund; met benzoaat is er een snelle reactie van pH 5,05 tot 7. Eiwit 4 maal verdund; met benzoaat is er een snelle reactie vanaf pH 4,5. Eiwit 2 maal verdund; met benzoaat is er een snelle reactie vanaf pH 4,1. Eiwit onverdund; met dubbelvolumen diazoreagens treedt een directe reactie op bij pH 1,85. Indien men de reactie bij dezelfde pH brengt met $\frac{1}{10}$ N zoutzuur

en $\frac{1}{2}$ volumen diazo, is de reactie negatief (pH 1,95).

Men ziet dus: 1 . dat bij toevoegen van meer eiwit de directe reactie bij lagere pH optreedt; 2 . dat de directe reactie afhankelijk is van het aantal ingebrachte diazomoleculen; met minder van deze bij dezelfde pH is geen snelle reactie aanwezig.

Wij merken op, dat deze proeven als het ware in het voorbijgaan werden genomen. We zijn er niet dieper op ingegaan en verkeerden omtrent de verklaring van deze uitkomsten geheel in het onzekere.

Tot nu toe bespraken we alleen de werking der anionen; er werd steeds zorg gedragen dat de kationen bij de proeven onderling gelijk waren.

Een duidelijke invloed van de eenwaardige kationen werd gedurende onze proeven met zouten niet waargenomen, bijv. KJ, NaJ en NH_4J of NaCl, KCl en NH_4Cl gaven bij gelijke pH ongeveer dezelfde reactie snelheid.

De tweewaardige kationen vertoonden eenige verschillen met de eenwaardige:

$$\begin{array}{l} \text{pH } 5,7 \text{ MgCl}_2 > \text{KCl} > \text{CaCl}_2 > \text{contrôle} \\ 4,5 \text{ contrôle} > \text{KCl} > \text{MgCl}_2 > \text{CaCl}_2 \\ 3,4 \text{ contrôle} > \text{KCl} = \text{MgCl}_2 = \text{CaCl}_2 \end{array}$$

De werking van een driewaardig kation, van AlCl_3 , is wisselend; bij pH 5,7 wordt de diazoreactie totaal geremd, bij pH 4,5 en 3,4 werkt dit zout meer versnellend dan KCl, MgCl_2 , CaCl_2 en contrôle. Een verder oordeel over de effecten der kationen kunnen wij niet geven.

Aan Adler en Strausz komt de verdienste toe, zoover ons bekend de eersten te zijn geweest, die op het verband tussen colloidalen toestand der serumeiwitten en snelheid der reactie hebben gewezen. Hun publicatie heeft niet de aandacht getrokken, die zij verdient, ook al omdat een theorie, die zij opperden, terstond ontzenuwd kon worden (verhoogd globulinegehalte bij directe reactie, zie bladz. 65).

Wel moet, zooals wij in bovenstaande zagen, de juistheid van vele door hen meegedeelde experimenteele feiten in twijfel getrokken worden.

Om nog terug te komen op het keukenzoutgehalte van het diazoreagens, is gebleken, dat, hoewel de concentratie hiervan gering is, er zeker een (versnellende) werking van uit gaat bij een zuurgraad boven pH 5,—. Het kan dus niet onverschillig zijn of bij de vorming van het diazoreagens meer nitriet gebruikt wordt. Afgezien van de werking in hoofdstuk II en III beschreven, is ook de zoo gevormde hoeveelheid keukenzout groter geworden, dus weer een variabele ingebracht. Reden te meer om te komen tot een standvastige samenstelling van het reagens.

Ook de zouten in het serum zullen een rol spelen; dit blijkt uit de volgende proef:

Indien men vertraagd serum tegenover water dialyseert, zoodat een deel van de zouten aan het serum onttrokken wordt, is de reactie van de rest veel trager geworden. Het eerste toegevoegde reagens wordt blijkbaar gebruikt om de deels neergeslagen serumeiwitten opnieuw in oplossing te brengen. Indien men evenwel de dialyse afbreekt vóór een neerslag ontstaat, blijkt de reactie toch aanmerkelijk trager te zijn dan in het niet gedialyseerde contrôleserum.

HOOFDSTUK VII

Eenige eigenschappen van bilirubine.

In het voorgaande werden de verschillende wijzen van reageeren der galkleurstof in het bloed met het diazoreagens en de invloed van de samenstelling van dit reagens op de reactiesnelheid besproken. Allerlei stoffen hebben de eigenschap de snelheid van koppeling te beïnvloeden, waarvan een aantal genoemd werden. Deze beïnvloeding gaat via den zuurgraad, via den colloïedalen toestand van het milieu, waarschijnlijk ook via de oplosbaarheid van bilirubine.

Indien vertraagd reageerend bilirubine zich in alcoholisch milieu bevindt, wat bij serum ontstaat door de eiwitten te praecipiteeren met het dubbele volumen 96 % alcohol, geeft het een prompte reactie met het diazoreagens; reeds bij pH 1.3 wordt prompt gekoppeld. Indien men nu echter het alcoholgehalte van 66 % terugbrengt tot 15 % gaat de koppeling zeer langzaam. Er is dan van den versnellenden invloed van het alcoholische milieu niet veel meer te merken. De pH is nog ongeveer dezelfde; door deze laatste te verhoogen door middel van bijv. pyridine of natriumbenzoaat, krijgt men reactieversnelling, zooals we deze reeds zijn tegengekomen bij het vertraagd reageerend natriumbilirubinaat. Indien men het alcoholische filtraat van direct reageerend bilirubine verdunt, blijft de reactie, hoe sterk de verdunning ook is, direct. Zuivere bilirubine, dat in den vorm van natriumbilirubinaat in alcohol is opgelast, gedraagt zich als vertraagd bilirubine.

IJs-azijn, dat een uitnemend oplosmiddel voor azobilirubine is (May, Martindale, Boyd) en dat ook natriumbilirubinaat oplost, heeft dergelijke eigenschappen als alcohol, doch veel minder duidelijk. Bij een vertraagd reageerend serum gevoegd, doet

het de reactie sneller worden, ondanks de lage pH van $\pm 1,5$.

Kerppola en Leikola zagen dat ijs-azijn gevoegd bij in chloroform opgelost bilirubine met diazoreagens een homogeen mengsel vormt, dat de directe reactie geeft. Zij schrijven de werking van ijs-azijn en alcohol toe aan hun eigenschap om van de chloroform, welke het bilirubine bevat, en het water van het diazoreagens een homogeen mengsel te maken. Hijmans van den Bergh, Kerppola en Leikola meenen, dat juist met deze bedoeling, nl. een zoogenaamde „Mischlösung” te maken, Ehrlich en Pröscher voor de door hen gevonden reactie alcohol gebruikt hebben.

Hetzelfde als alcohol en ijs-azijn doet aceton, waarvan de reactievernellende werking door Lepehne werd gevonden. Ook hiervan is een zekere minimum concentratie noodig om de reactie direct te maken.

Ook aceetaldehyd en boterzuur zouden volgens Kerppola en Leikola „Mischlösungsmittel” zijn.

Uit den versnellenden invloed van alcohol en aceton mag men niet de conclusie trekken, dat door de genoemde stoffen vertraagd bilirubine in direct bilirubine wordt omgezet. Het is ook mogelijk, dat door den alcohol bilirubine losgemaakt wordt uit een binding aan lipoïed of eiwit en zodoende beschikbaar wordt voor de reactie.

In het verschillend gedrag ten opzichte van het diazoreagens hebben we een wel is waar quantitatief niet sterk, maar toch vrij duidelijk verschil tusschen de twee verschijningswijzen van bilirubine; het vertraagd reageerend bilirubine reageert wel is waar veel langzamer dan het directe bilirubine, maar op den langen duur toch ook; verder wordt de reactie door bijv. alcohol sterk versneld. Of deze versnelling ook voor het direct reageerend bilirubine aanwezig is, onttrekt zich gedeeltelijk aan onze waarneming.

Het direct bilirubine bevattende serum zou na kort verwarmen vertraagd worden (Hijmans van den Bergh, Lepehne). Wij konden dit niet bevestigen (zie ook bladz. 75, 88).

Newman deelt mee dat bij staan in een zuurstofvrije atmos-

feer direct bilirubine vertraagd van reactie wordt via een biphasische reactie; ook zou er dan in chloroform oplosbaar pigment ontstaan.

Wij zagen, dat na bewaren van serum aan de lucht, de reactie met het diazoreagens trager werd; de oplosbaarheid in chloroform nam hierbij niet duidelijk toe.

Een verder verschil tusschen de twee modificaties van bilirubine is het gemak, waarmee zij geoxydeerd worden.

Hijmans van den Bergh maakte op dit verschil opmerkelijk. Bij staan aan lucht en licht krijgt direct reageerend serum vrij snel een groene kleur, vertraagd serum pas na veel langer tijd.

Het is soms opvallend, dat serum afkomstig van een patient met zeer sterken afsluitings-icterus bij afcentrifugeeren kort na het afnemen van het bloed al een groene tint vertoont; mogelijk is in de circulatie dit groene pigment reeds aanwezig, te meer ook daar lang bestaande afsluitings-icterus den patiënten soms een groenachtige tint geeft. Davies en Dodds vonden in deze kleur der patiënten een steun voor hun theorie omtrent het wezen van direct en vertraagd bilirubine (zie bladz. 78).

Andrewes behandelde sera met zwakke oxydatiemiddelen als jodium- en ferrichloride-oplossingen; hij zag ook steeds het directe bilirubine sneller omgezet worden dan het vertraagde.

Ook bij bestraling met zonlicht of ultra-violette stralen komt het verschil in oxydatiesnelheid tot uiting. Sivo en Forrai¹⁸²⁾ bemerkten, dat bilirubine in urine sneller geoxydeerd werd dan in serum. Voegde men aan de urine een weinig eiwit toe, dan verliep de oxydatie langzamer.

Hartog ging nogmaals de oxydatiesnelheid na van bilirubine-bevattend serum. Hij bestraalde in open schaaltes het serum met ultra-violet licht; de concentratie aan niet ontlede bilirubine was een maat voor de oxydatie-snelheid; direct bilirubine werd veel sneller omgezet dan vertraagd.

Echter onttrekken zich niet alle oxydatietrappen van bilirubine aan het aantoonen door middel van de diazoreactie. Pröschner deelt mee, dat bilifuscine en biliprasine de diazoreactie (in alcoholisch milieu) geven. Hijmans van den Bergh bevestigde,

dat met biliprasine de diazokoppeling in alcoholisch milieu optrad. Davies en Dodds konden „direct reageerend bilirubine” (natriumbilirubinaat in fosphaat buffer) oxydeeren met waterstofsuperoxyd of erythrocyten-emulsies. De zoo ontstane groene kleurstof gaf met alcohol een roode diazoreactie.

Griffiths en Kaye bereidden uit gal een groen oxydatie-product van hun „direct reaction pigment”, dat na alcoholtoevoeging de diazoreactie vertoonde. Al deze feiten samen doen onderstellen, dat het groene pigment, dat zich zeer snel in directe sera en gal vormt, geen biliverdine is, daar hiervan vele malen werd vastgesteld, dat het de diazoreactie niet meer geeft (o.a. H ij m a n s v a n d e n B e r g h, Griffiths en Kaye, May, Martin d a l e e n B o y d).

Wij behandelden verse geelbruine varkensgal met het dubbele volumen ijs-azijn; dit mengsel heeft aanvankelijk een gele kleur, is na 2 uur staan mosgroen en na 8 uur hardgroen. Maakt men het mengsel van gal en ijs-azijn onmiddellijk alcalisch, dan blijft de kleur geel; doet men dit na 2 uur, dan gaat de mosgroene kleur in geel over; doet men het na 8 uur, dan blijft de hardgroene kleur bestaan.

Voegt men aan gal met ijs-azijn onmiddellijk diazoreagens toe, dan is de kleur aanvankelijk roodviolet, na alcalisch maken groen; na 2 uur staan eerst donker violet, na alcalisch maken staalblauw; na 8 uur staan ziet men geen diazoreactie meer optreden, zelfs niet na alcoholtoevoeging.

Na korten tijd is dus in de gal een groen pigment ontstaan, dat de diazoreactie in een milieu van ijs-azijn echter nog wel geeft. Dezelfde verschijnselen kan men zien met direct serum, vertraagd paardenserum, het eiwitpraecipitaat van direct serum en een oplossing van natrium-bilirubinaat. De laatste is eveneens zachtgroen van kleur en geeft zelfs na eenige dagen nog met ijs-azijn de diazoreactie.

Waarschijnlijk berust de groene kleur, die men in sera van lang bestaanden stuwings-icterus ziet, niet op biliverdine; immers deze laatste stof geeft geen diazoreactie. Of het dezelfde stof is, die men bij voorzichtige oxydatie in ijs-azijn ziet ontstaan, is niet te zeggen. Misschien is deze groene kleur in het serum in vivo reeds

aanwezig. Dit zou vast te stellen zijn door het bloed van een dergelijken patiënt onmiddellijk onder paraffine in een zwarte buis op te vangen en zoo te centrifugeeren; licht en lucht worden dan bij de behandeling verre gehouden.

Een andere methode lijkt uitvoerbaar door een dergelijke handelwijze als *Fahraeus*⁵²⁾ voor de bezinkingssnelheid der roode bloedcellen toepaste.

Men brengt den arm in een verticalen stand naar boven gericht en snoert de vene aan den bovenarm af; na een half uur hebben de erythrocyten tijd gehad om te bezinken. Men puncteert dan de armvene dicht bij de hand, en krijgt zodoende vrijwel uitsluitend plasma, wanneer de patiënt een verhoogde bezinkings-snelheid heeft, wat bij zoo sterke stuwingsgeelzucht wel steeds het geval zal zijn. Dit in vivo gemaakt plasma zou men dan op de kleur moeten onderzoeken.

Het verschil in oxydatiesnelheid van direct en vertraagd bilirubine wijst niet rechtstreeks op een chemisch verschil tusschen twee bilirubinevormen. Wij meenen hierin eerder een uiting te zien van het verschillend milieu, waarin bilirubine verkeert. Hierop wijst ook de proef door *Sivo*⁶²⁾ gedaan (zie bladz. 48).

Wij zagen dat een oplossing van natriumbilirubinaat, welke kippeneiwit bevat, na schudden met rhodaankali veel sneller oxydeerde dan de contrôle, welke zonder zout werd geschud (schudden kan de pH veranderen door CO_2 der lucht en doet dit ook; daarom moeten beide geschud worden). Ook hierbij geven bijomstandigheden, die buiten het bilirubine zelf liggen, den doorslag of deze stof direct of vertraagd zal reageeren.

Een ander verschil tusschen direct en vertraagd reageerend bilirubine is, dat vertraagd in chloroform oplosbaar, direct daarentegen onoplosbaar zou zijn.

Door *Grunenberg* werd dit feit het eerst waargenomen, door eenige anderen werd het bevestigd.

Andrews was in groote trekken de meening van *Grunenberg* toegedaan, doch dat het oplossen zoo makkelijk ging als deze zeide, kon hij niet bevestigen.

Roberts nam ook het verschil in oplosbaarheid in chloroform

aan, evenals de Castro, Kerppola, Varela, Hartog en vele anderen. Echter Hijmans van den Bergh, Weltmann en Hückel e.a. zien, dat bij schudden van verse gal met chloroform een belangrijk deel der kleurstof in de chloroformlaag overgaat. Daarentegen blijkt een vertraagd reageerend serum groote hoeveelheden niet in chloroform overgaand pigment te bezitten. Omgekeerd gaat bij schudden met chloroform van serum bij stuwingsicterus een deel van het pigment hierin over. Na aanzuren zou ook het directe bilirubine in de chloroformlaag overgaan (Kerppola, Grunenberg⁷³⁻⁷⁴) e.a.).

Men mag zeggen, dat vertraagd bilirubine gemakkelijker oplost in chloroform dan direct bilirubine, absoluut is het kenmerk voor geen van beide.

Davies en Dodds schrijven die meerdere of mindere oplosbaarheid in chloroform toe aan den toestand van het milieu, waarin het bilirubine zich bevindt.

De betere oplosbaarheid van vertraagd bilirubine in chloroform blijkt uit het volgende. Een direct en een vertraagd reageerend serum worden met het dubbele volumen alcohol behandeld; bij de alcoholische filtraten wordt chloroform gevoegd, waarbij een heldere vloeistof ontstaat. Voegt men nu aan beide mengsels water toe, dan scheiden zich de chloroform- en alcohol-waterlaag. Het blijkt nu, dat de bilirubine van het vertraagde serum door betrekkelijk weinig water overgaat in de chloroformlaag; bij het filtraat van direct serum is veel meer water noodig vóór het grootste deel der galkleurstof in de chloroform overgaat. Blijkbaar is dus de oplosbaarheid van de bilirubinesoorten in chloroform wel verschillend, doch niet in die mate als Grunenberg, meende (Roberts).

Ook ten opzichte van het kenmerk der oplosbaarheid in chloroform is het onderscheid tusschen de bilirubinesoorten niet meer dan quantitatief.

Verder onderscheiden zich de twee bilirubinemodificaties in het al of niet zich hechten aan het eiwitneerslag bij het onteiwitten met alcohol. Zooals de meeste belangrijke verschillen tusschen direct en vertraagd reageerend bilirubine werd ook deze eigenschap door Hijmans van den Bergh ontdekt. Hij zag, dat

bij praecipitatie met het dubbele volumen alcohol van het direct reageerende serum een vrij groot deel der kleurstof aan het neerslag bleef hechten; van het vertraagde serum daarentegen niets of slechts een zeer klein gedeelte. Deze eigenschap van het directe bilirubine was een struikelblok bij de oorspronkelijke quantitative bilirubinebepaling, zooals later besproken zal worden. Dit verschijnsel is aanleiding tot veel onderzoek geweest. Het bleek, dat indien een icterus aan het verdwijnen was, een steeds grooter deel zich aan de eiwitten hechtte, bij beginnende stuwingsicterus was het aankleven wel duidelijk, doch minder intensief. Reeds Meulengracht¹³⁹⁾ was dit opgevallen; het werd klinisch bevestigd door Wiemer²⁰⁸⁾, Weltmann en Jost²⁰³⁾. Ook Fiessinger^{57,58,59)} komt tot deze conclusie, evenals Jourdain¹⁰⁹⁾. Het verschijnsel is niet verklaard. Het geeft moeilijkheden voor enkele theorieën omtrent het wezen van vertraagd bilirubine. Zoo is het bijv. niet duidelijk voor hen, die meenen, dat het vertraagde bilirubine in colloïdale oplossing verkeert, waarom bij de praecipitatie der eiwitten juist dit bilirubine zoo weinig aan het neerslag blijft hechten. Eenzelfde moeilijkheid ondervinden zij, die meenen, dat alleen vertraagd bilirubine aan eiwit gebonden is.

Ook ten opzichte der adsorptie bestaat tusschen de twee bilirubinemodificaties slechts een quantitatief verschil. Vertraagd bilirubine adsorbeert steeds aan de eiwitten, zij het weinig. Wij overtuigden ons hiervan door het praecipitaat, na het te hebben uitgewassen met alcohol, welke daarna geheel verwijderd werd, op te lossen in ijs-azijn. Na diazotoevoeging ontstond de paars-roode kleur van zuur azobilirubine.

Ook bleek het ons mogelijk door toevoeging van zuur de adsorptie van bilirubine in vertraagd serum te verhoogen, zoodat zich bijna alles aan de eiwitten hechtte:

- a. $\frac{1}{2}$ cc serum + 0,3 cc $\frac{1}{10}$ N zoutzuur + 0,3 cc water + 2,2 cc alcohol 96 % geeft een zeer bruin praecipitaat in vergelijking met
- b. $\frac{1}{2}$ cc serum + 0,6 cc water + 2,2 cc alcohol 96 %; de bovenstaande vloeistof van a bevat nog slechts weinig bilirubine.

Toevoegen van meer zoutzuur deed een kleurlooze bovenstaande vloeistof en een sterk gekleurd praecipitaat ontstaan, dat echter moeilijk uitzakke.

Omgekeerd konden we het praecipitaat van direct serum bijna kleurloos maken door loog toe te voegen:

- a. 1 cc serum + 0,25 cc $\frac{1}{10}$ N loog + 2,5 cc alcohol 96 % gaf een bijna wit praecipitaat in vergelijking met
- b. 1 cc serum + 0,25 cc water + 2,5 cc alcohol 96 %; de bovenstaande vloeistof van a, welke niet geheel helder was, bevatte meer bilirubine dan bij b.

Het lijkt dus wel of de ladingstoestand der eiwitten van invloed is op de sterkte der adsorptie. Ook hier zien we weer, dat het milieu bepaalt hoe bilirubine zich zal gedragen.

Een volgend verschil zou daarin bestaan dat het bilirubine uit direct serum moeilijk als zoodanig te bereiden is, uit vertraagd serum daarentegen eenvoudiger. Ook dit is door H i j m a n s v a n d e n B e r g h ¹⁰²⁾ opgemerkt. Echter mist men in zijn publicatie de meedeeling of de stof, die hij uit serum van een patiënt met stuwingsicterus bereidde, de directe diazoreactie gaf. Het viel verder op, dat uit een neerslag door loodacetaat gevormd in het alcoholische filtraat van direct serum het bilirubine kon worden uitgeloozd met 3 cc chloroform, welke 1 druppel verdund zoutzuur bevatten.

Deze oplosbaarheid in chloroform is een andere dan G r u n e n b e r g eischt.

De snellere oxydeerbaarheid is voor de moeilijker bereidingswijze een gereede verklaring. De reden der snelle oxydeerbaarheid zoeken wij in het milieu, waarin de bilirubine verkeert.

Vervolgens verschillen de twee bilirubine-varieteiten in het gedrag t.o.v. dialyse en ultrafiltratie. Meestal wordt aangegeven dat direct bilirubine zou dialyseren en ultra-filtreerbaar zijn, vertraagd bilirubine zou (door zijn eiwitbinding) ondialyseerbaar en niet ultra-filtreerbaar zijn.

Vermoedelijk hebben H o o v e r en B l a n k e n h o r n ⁹²⁾ zich het eerst hiermede bezig gehouden. De onderzoeken van

Hijmans van den Bergh omtrent de diazoreactie waren hun niet bekend. Zij zagen, dat uit serum van patiënten met stuwingsicterus een meer of minder groot deel van de galkleurstof de collodiummembraan passeerde; bij serum afkomstig van patiënten met acholurischen icterus was dit niet het geval. Zij concludeerden, dat, daar het directe bilirubine vlot dialyseert, dit de reden was, dat bij stuwingsgeelzucht de galkleurstof in de urine verschijnt; zij dialyseerden tegen water en 50 % alcohol.

Omtrent dialyse schrijft Hijmans van den Bergh in zijn monographie, blz. 46: „Ausserdem ist es wahrscheinlich das Bilirubin im Serum ganz oder teilweise an Eiweisz gebunden vorkommt. Wir konnten es wenigstens weder durch Ultrafiltration noch durch Dialyse von den Eiweiszsubstanzen trennen”.

Waarschijnlijk is het dus hem noch met direct, noch met vertraagd serum gelukt de daarin zich bevindende bilirubine de membraan te doen passeeren.

Brulé, Garban, Weissmann⁹²⁻²⁹⁾ herhaalden de proeven van Blankenhorn en Hoover²⁶⁾, met in groote trekken hetzelfde resultaat. Soms was direct bilirubine dialyseerbaar, soms niet. Bij vertraagd bilirubine vond geen dialyse plaats. Deze schrijvers zijn iets minder positief in hun conclusies dan Blankenhorn en Hoover.

Leschke¹³²⁾ meent, dat bij ultrafiltratie direct bilirubine de membranen passeert, vertraagd bilirubine niet; beide stoffen zouden niet dialyseerbaar zijn.

Morrell Roberts¹⁶⁸⁾ vindt direct bilirubine dialyseerbaar tegen water, ook tegen normaal serum.

Collinson en Fowweather vinden, dat bilirubine uit gal en stuwingsserum de perkamentmembraan passeert. Serum van haemolytische icterus passeert de membranen niet; voegt men aan het serum alcohol toe, dan treedt dialyse op. Zij denken daarom, dat bilirubine in gal en serum van stuwingsgeelzucht in ware, in vertraagd serum in colloïdale oplossing voorkomt.

Marengo en Dominici⁴²⁾ geven aan, dat direct en vertraagd bilirubine beide door 4½ % collodiumfilters gaan.

Tegenover deze mededeelingen staan de waarnemingen van Davies en Dodds, dat het bilirubine uit gal snel door de

membranen gaat, bilirubine van direct reageerend serum daarentegen niet dialyseert. Zij meenen, dat het milieu den doorslag geeft of dialyse plaats vindt.

Forrai en Sivo⁶²⁾ merken bij ultrafiltratie, dat direct en vertraagd bilirubine beide de collodiummembraan niet passeerden; evenmin ging de kleurstof uit gal door de membraan. Bilirubine in urine en bilirubinaatoplossing passeerden hun membraan wel. Volgens hen verhinderen eiwit of eiwitachtige stoffen de passage. Indien zij benzoas natricus c. coffeino, welke stof volgens Adler en Strausz een ontzwellende werking op de eiwitten zou hebben, met de sera of gal mengden, ging de galkleurstof door de membranen heen. Indien bij de bilirubinaatoplossing een weinig eiwit werd gevoegd, ging zij niet meer door de membraan. Bij deze proeven controleerden zij of de huls voor eiwit doorgankelijk was door middel van sulfosalicylzuur; ging een spoor eiwit door de filters dan ging bilirubine ook door.

Weltmann en Hückel konden bilirubine niet door een vischblaascondoom dialyseren; toevoeging van benzoas natricus c. coffeino veranderde dit niet. Zij verwerpen hierom de eiwitbinding en gelooven niet in de ontzwellende werking van benzoaat.

Bendien en Snapper¹⁸⁾ vonden, dat direct noch vertraagd bilirubine bij ultrafiltratie de collodiummembraan passeerden zoolang de hulzen niet doorlaatbaar waren voor eiwit. Indien dit wel het geval was, dan passeerden beide modificaties de membraan. Het eiwit van hun ultrafiltraat bestond voor het grootste deel uit albumine (zie bladz. 66, 77). Zij concludeerden uit hun proeven, dat de galkleurstof direct zoowel als vertraagd aan albumine gebonden is. Hartog brengt hiertegen in, dat uit urine, welke geen eiwit bevat doch wel bilirubine, deze stof toch niet ultrafiltreerbaar is. Hij oppert, dat het bilirubinemolecuul te groot is om het filter te passeeren. Ook hij kon direct noch vertraagd bilirubine door collodium of perkament dialyseren tegenover water. Beide stoffen dialyseerden wel tegenover 50 % alcohol. Ook de Castro³³⁾ nam waar dat direct bilirubine niet dialyseerde.

Bij een groot aantal dialyseproeven boekten wij de volgende resultaten:

Direct noch vertraagd bilirubine passeerden de perkament-membraan tegenover water.

Natriumbilirubinaat passeerde niet, noch tegenover water, noch tegenover zeer slappe natronloog.

Bilirubine uit gal passeerde de membraan zeer gemakkelijk. Ook urobilinogeen gaat door de filters, althans een stof, die met Schlesingers' reagens fluorescentie gaf en met diazoreagens geel verkleurde; ook de galzure zouten passeeren de membraan gemakkelijk.

Zuivere bilirubine, opgelost in chloroform, gedialyseerd tegen chloroform, passeerde de membraan niet.

Direct en vertraagd bilirubine bevattend serum, ieder gemengd met een gelijk volumen 25 % benzoas natricus dialyseerden niet tegenover water, evenmin tegenover 12½ % benzoas natricus.

Direct en vertraagd bilirubine bevattend serum, ieder gemengd met een gelijk volume normaal rhodaankalium, dialyseerden niet tegenover water, evenmin tegenover ½ normaal rhodaankalium.

Natriumbilirubinaat in water opgelost, gemengd met eenige galzure zouten (natriumtaurocholaat, natriumcholaat) dialyseerde niet tegenover water of slap alcali; wel verschenen de galzure zouten in de omringende vloeistof.

Direct en vertraagd serum, gemengd met galzure zouten, dialyseerden niet tegenover water, wel komen de galzure zouten in de omringende vloeistof.

Natriumbilirubinaat in 50 % alcohol gedialyseerd tegenover 50 % alcohol ging in zeer geringe mate door de membraan.

Natriumbilirubinaat in 66 % alcohol tegenover 66 % alcohol gaf iets meer passage te zien.

Natriumbilirubinaat in 80 % alcohol tegenover 80 % alcohol geeft flinke passage door de membraan.

Alcoholisch filtraat van vertraagd serum tegenover water gaf geen dialyse.

Alcoholisch filtraat van vertraagd serum tegenover 66 % alcohol gaf geringe dialyse.

Alcoholisch filtraat van direct serum tegenover water gaf geen dialyse.

Alcoholisch filtraat van direct serum tegenover 66 % alcohol gaf geringe dialyse.

Direct serum met diazoreagens: er ontstond azobilirubine, dat tegenover water niet dialyseerde.

Bilirubinaat in 50 % alcohol met een weinig diazoreagens; er ontstaat azobilirubine, dat tegenover 50 % alcohol niet dialyseert.

Gal met diazoreagens: er ontstaat azobilirubine, dat tegenover water niet dialyseert.

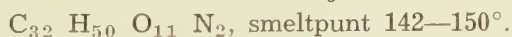
Bij al deze proeven werd de omringende vloeistof met sulfo-salicylzuur en kookproef op eiwit onderzocht; indien eiwit de membraan passeerde, werd de proef met andere filters herhaald. Alle proeven geschieden minstens in duplo. De duur der dialyse was van 24 tot 3×24 uur.

Een passage door de membraan tegenover water werd (behalve bij gal) niet waargenomen. Men krijgt den indruk alsof de bilirubinedeeltjes in waterige oplossing op zichzelf te groot zijn om te dialyseren; ook azobilirubine is daar niet toe in staat.

Tegenover vrij sterken alcohol begint passage op te treden.

Bilirubine uit gal passeert daarentegen de membraan wel tegenover water, azobilirubine niet meer. Misschien dat de bilirubine uit gal een kleiner molecuul bezit dan de bilirubine, die in bloed wordt aangetroffen, of de handelsbilirubine. De toevoeging van de diazoniumverbinding aan het bilirubine zou dan het deeltje te groot maken, zoodat het ondanks de invoering van een sulfogroep (zie onder) de membraan niet meer kan passeeren.

Op grond van chemisch onderzoek komt Griffiths⁷²⁾ tot een geheel andere opvatting over de grootte van het bilirubine-molecuul. Deze heeft uit gal een stof geïsoleerd, welke hij „direct reaction pigment” noemt en die volgens hem het direct reagerende bilirubine is. Hiervoor vindt hij de formule:



Deze stof met 95 atomen is grooter dan bilirubine, waarvoor Küster^{122, 123, 124)} de formule $\text{C}_{33} \text{H}_{36} \text{O}_6 \text{N}_4$ gaf, met een atoomaantal van 79.

Daargelaten dat het niet zeker is, dat de stof door Griffiths

geïsoleerd zuiver was (zie bladz. 82), meenen we een bezwaar tegen deze formule te moeten inbrengen.

„Bilz (volgens K r u y t ¹²¹) vond in het algemeen, dat, indien het atoomaantal minder was dan 45, zij (organische kleurstoffen) snel de dialysemembraan passeerden, boven de 45 langzamer, van 55 tot 70 zeer langzaam of in het geheel niet, boven de 70 beslist in het geheel niet. Het bleek hem, dat de zooeven genoemde grenzen verhoogd worden, indien zich sulfogroepen in het molecuul bevinden, verlaagd daarentegen, indien alizarinegroepen aanwezig zijn. De grootte van het molecuul zonder meer is dus niet maatstaf voor zijn diffusibiliteit, maar klaarblijkelijk wordt het verschijnsel beheerscht door fysisch-chemische eigenschappen, die wel min of meer parallel lopen met de molecuul-grootte, maar ook beheerscht worden door constitutieve eigenschappen van het molecuul”.

Nu passeert een stof uit gal met een atoomaantal van 95 de membraan, terwijl een stof met een atoomaantal van 79 dit niet doet. Indien men in de laatste stof door diazoteering een sulfogroep aanbrengt, vindt nog geen passage plaats; echter wordt hierbij het atoomaantal ook grooter en welke dezer twee elkaar tegenwerkende krachten den sterksten invloed zal uitoefenen, is niet te zeggen. Uit de waarneming, dat de kleurstof uit gal de membraan wel passeert, azobilirubine uit gal niet, krijgt men den indruk, dat de vergrooting van het molecuul bij diazoteering meer van invloed is dan de ingevoerde sulfogroep. Een en ander leek een bezwaar tegen de formule die Griffiths aan zijn „direct reaction pigment” gaf. Mogelijk is bijv. een verontreiniging met galzure zouten, daar er soms nog troebeling optrad bij toevoeging van het zure diazoreagens.

Het opgegeven verschil in dialyseerbaarheid der bilirubine-modificaties is ons geen verschil gebleken; zoomin direct als vertraagd bilirubine dialyseerden. Het afwijkende gedrag der gal, waarvan het bilirubine wel door de membraan gaat, zou in strijd zijn met onze opvatting. Doch wij maken nog op twee mogelijkheden opmerkzaam:

- 1°. het is mogelijk, dat de bilirubine in bloed in moleculaire associaties aanwezig is, dat dus de deeltjes daarin te groot zijn om de membraan te passeeren;
- 2°. kan de bilirubine der gal door een andere stof geholpen worden bij het passeeren der membraan. Blijkbaar zijn dan de galzure zouten zelf hier niet alleen voor verantwoordelijk (zie bladz. 56).

Een laatste verschil tusschen direct en vertraagd bilirubine is het feit, dat het directe bilirubine in de urine overgaat, het vertraagde niet (Hijmans van den Bergh, Blankenhorn en Hoover, enz.). Tegenover dit feit staan enkele waarnemingen, dat ook in de urine van patiënten, die leden aan een ziekte waarbij verhooging van het vertraagde bilirubine in het bloed optreedt, bilirubine en door gal gekleurde cylinders verschenen (Schiff en Eliasberg, Rosenthal en Holzer¹⁷¹) e. a.).

Enkele van deze onverwachte bilirubinurieën worden gevonden bij patiënten met icterus haemolyticus. Zij zouden kunnen berusten op een compliceerende bilirubinsteinen in de galblaas. Wij zagen eenige patiënten met icterus haemolyticus met een zwakke directe reactie in het bloedserum. Deze patiënten bleken tevens galstenen te hebben; bilirubinurie bestond bij hen evenwel niet.

Al bestaat dan ook een verschil der twee bilirubinemodificaties, dan behoeft dit nog niet op een chemisch verschil te wijzen. O. i. is de verklaring in den toestand, waarin het bilirubine in het serum voorkomt, te zoeken.

Injectie in de bloedbaan van bilirubinaatoplossing doet in het algemeen geen bilirubinurie ontstaan (Eillbot); indien men echter gelijktijdig een oplossing van galzuurzout (decholine) inspuit, treedt bilirubinurie op (Wespi²⁰⁵). Galzure zouten hebben de (in hoofdstuk V) besproken solvateerende werking op colloïden, werken daarbij nog als buffer. Bij de op deze wijze verkregen bilirubinurie zouden wij een directe reactie in het serum verwachten. Dit werd door Wespi echter niet

nagegaan. Zelf konden wij door vertraagd serum met galzure zouten te mengen wel een reactieversnelling verkrijgen, doch geen prompte reactie.

Omtrent de verschillen, die tusschen direct en vertraagd bilirubine worden opgegeven, gaven wij een critisch overzicht. Wij meenen, dat van die verschillen die zeker aantoonbaar zijn, (diazoreactie, oxydatiesnelheid, hechten aan het eiwitneerslag, passage in de urine) een verklaring kan gezocht worden in den toestand der serumcolloïeden, zoowel wat betreft de solvatatie, respectievelijk den dispersiteitsgraad, als den ladingstoestand.

Buiten dit overzicht moeten wij het in de literatuur bekende verschil in dialyseerbaarheid houden, daar wij dit verschil niet konden aantonen. Wat het twijfelachtige verschil in oplosbaarheid in chloroform betreft, merken wij op, dat dit niet meer dan gradueel is. Omtrent de plaats van het bilirubine in het colloïdale plasmasysteem tasten wij op zeer veel punten nog in het duister (bilirubine zelf een colloïed? bilirubine geadsorbeerd aan colloïdale partikels van meerdere of mindere grootte? zijn deze colloïedepartikels eiwitten? lipoïeden? een complex van deze?).

HOOFDSTUK VIII

Verklaringen voor het verschil in reactiewijze tusschen direct en vertraagd reageerend bilirubine.

De vraag, waaraan de verschillende reactiewijzen van het bilirubine, nl. de directe en de vertraagde reactie, te danken zijn, is aanleiding geweest tot het opstellen van zeer veel, meer of minder gelukkige theorieën. Of in het volgende hiervan een geheel volledig overzicht kan worden gegeven mag betwijfeld worden, doch wel meenen wij de voornaamste theorieën te hebben vermeld.

In groote trekken kan men de verklaringen indeelen in de volgende groepen:

I. Direct en vertraagd bilirubine is dezelfde stof; de verschillende wijze van reageeren zou te danken zijn aan het verschil van milieu, waarin het bilirubine zich bevindt, of ook aan het feit, dat een der bilirubines gebonden is aan een bepaalde stof (eiwit, lipoïed).

II. Direct en vertraagd reageerend bilirubine zijn verschillende stoffen.

III. Het verschil tusschen direct en vertraagd reageerend bilirubine is afhankelijk van de hoeveelheid galkleurstof, die het bloedserum bevat; bij geringe hoeveelheden is de reactie vertraagd, bij grootere hoeveelheden direct; daartusschen bestaan overgangen. Wij zullen nu achtereenvolgens deze verschillende theorieën bespreken en van de meeste eenige voor- en nadeelen noemen.

AD. I. A. De **galzure zouten**, die bij de galstuwing in bloed en urine aanwezig zijn, maken dat de reactie direct verloopt (o.a. Steenhout en Boeckaert¹⁸⁶), Wiemer²⁰⁸), Barron¹⁵).

Thannhauser en Andersen ontkennen den versnelenden invloed der galzure zouten en zien zelfs dat toevoeging van deze aan vertraagd serum de reactie nog verlangzaamt.

Chabrol nam bij de toestand die Brulé ictère dissocié noemde waar, (stuwingsicterus waarbij nog wel bilirubine doch geen galzure zouten in de urine aantoonbaar zijn) dat de bilirubine-reactie in bloed direct was, zoodat hij een verband met de aanwezigheid der galzure zouten ontkent.

Tot dezelfde conclusie komen Acél en Goldgrüber, op grond van bepalingen van galzure zouten in het bloed.

Paterni¹⁵⁵) gelukte het niet door toevoeging van taurocholas natricus of glycocholas natricus in vertraagde sera een directe reactie te verkrijgen.

Wij voegden aan vertraagd reageerend serum wisselende hoeveelheden toe van de zouten van taurocholzuur, glycocholzuur, cholzuur, dehydrocholzuur en zagen niet, dat hierna de reactie prompt werd; wel werd de reactie versneld. Aan een oplossing van natriumbilirubinaat toegevoegd, konden de zouten der galzuren een directe reactie teweegbrengen, als zeer groote hoeveelheden dezer laatste werden ingebracht. Indien het al mogelijk is om met galzure zouten een reactie te versnellen, meenen wij dat dit daardoor veroorzaakt wordt, dat door sterke zuren de galzuren worden vrij gemaakt, en dan praecipiteeren. Hierdoor wordt een deel der waterstofionen aan de vloeistof onttrokken en zodoende de pH verminderd. De werking zou dus berusten op een bufferwerking op dezelfde wijze als wij gezien hebben bij acetaat en benzoaat. Mogelijk oefent ook het zout nog een werking uit op de colloïden van het serum, in dien zin, dat de reactie er door versneld wordt. Wanneer wij aan gal rijkelijk diazoreagens, bijv. het dubbele volume toevoegden, of wanneer wij aan gal diazoreagens plus overmaat zoutzuur toevoegden, was de reactie van gal niet meer direct; er trad in het geheel geen reactie op, de vloeistof werd zeer troebel door het praecipiteeren der galzuren en aan dit praecipitaat hechte zich de aanwezige bilirubine, welke zich blijkbaar zoo aan de reactie onttrok. Voegden wij aan deze troebele massa voorzichtig natronloog toe, dan trad een

directe reactie op, naarmate de galzure zouten meer in oplossing gingen.

Men kan nu de mogelijkheid opperen, dat men bij gal niet te maken heeft met direct, doch met vertraagd reageerend bilirubine, hetwelk slechts in een bepaald, weinig zuur traject direct kan reageeren.

Om deze meening te toetsen deden wij eenige metingen der waterstofionenconcentratie. De pH van versehe varkensgal bleek 7,52 te zijn; na toevoeging van $\frac{1}{2}$ volume diazo was de reactie direct, de pH was 4,9. Na toevoeging van een gelijk volume diazo was de reactie direct bij pH 4,35. De vloeistof was in het laatste geval gedeeltelijk troebel. Hoe lager de pH van het gal-diazomengsel wordt, des te troebeler is de vloeistof. Aangezien een bilirubinaatoplossing nog direct kan reageeren op pH 3,7, is het uit deze proef niet duidelijk geworden, dat gal een andere stof bevat als bilirubine of een zout daarvan. Het is hierdoor dus niet zeker, dat de galkleurstof in gal een andere stof is dan een oplossing van bilirubinaat. Wel zijn de omstandigheden in de oplossing geheel anders dan in een waterig milieu.

Ook of gal vertraagd reageerend bilirubine bevat, is moeilijk vast te stellen. Zij, die meenen, dat slechts vertraagd reageerend bilirubine in chloroform kan oplossen, zouden, daar gal, met chloroform geschud, een duidelijke verkleuring der chloroformlaag geeft, aan kunnen nemen, dat absoluut versehe varkensgal vertraagd bilirubine in groote quantiteit bevat. Zooals evenwel reeds eerder werd uiteengezet, is de oplosbaarheid in chloroform een onbetrouwbaar criterium voor de onderscheiding van direct en vertraagd bilirubine.

AD I. B. Het **cholesterine**, in verhoogde hoeveelheid in het bloed aanwezig, zou de vertraagde reactie direct maken.

Dit standpunt is door A. Adler⁵⁾ verdedigd. Ook Lubarsch acht dit mogelijk en denkt dat de directe reactie in gal door het cholesterine bevorderd wordt.

Rosenthal en Holzer¹⁷¹⁾ zagen, dat bij stuwingsicterus cholesterine in het bloed meest vermeerderd was: bij haemolytische anaemieën met vertraagde reactie vonden zij nor-

maal of verlaagd gehalte van cholesterine in het bloed. Een verband tusschen cholesterine en soort van diazoreactie achten zij mogelijk.

Tegen deze meening werd opgekomen door Thannhauser en Andersen¹⁹⁵). Zij voegden cholesterine en cholesterine-esters aan het bloed toe en zagen de vertraagde reactie niet direct worden.

Julesz en Winkler¹⁰⁸) verwekten bij icteruspatiënten met cantharidepleister blaren; het in deze blaren aanwezige vocht bleek op dezelfde wijze te reageeren als het bloedserum; zij vonden echter, dat het cholesterine-gehalte van het serum en dat van den blaarinhoud in het geheel niet parallel gingen. Hieruit leidden zij af, dat het cholesterine-gehalte van de vloeistof niet van invloed kan zijn op de wijze van reageeren van het bilirubine. Dergelijke proeven deed ook Scherk¹⁷⁷).

Campbell³⁰) bepaalde het cholesterine-gehalte van het bloed bij zeer verschillende ziekten, en zag, dat het bij patiënten met stuwingsgeelzucht meestal sterk verhoogd was. Maar bij patiënten, bij wie het cholesterine-gehalte nog hooger was, bleef het bilirubine, dat het serum bevatte, geheel traag reageeren.

Acél en Goldgrüber¹) bepaalden bij patiënten met leverziekte het cholesterine-gehalte van het bloed. Zij nemen geen verband aan tusschen hoeveelheid cholesterine en directe reactie, en zien in de aanwezigheid van beide een toevallig samengaan.

AD. I. C. De **alcalireserve** van het bloed zou de oorzaak zijn van het verschillend reageeren. Deze theorie werd door Mac Gowan⁶⁹) geopperd; hij meent, dat bij icterus met vertraagd bilirubine de verlaagde alcalireserve een oorzakelijke rol zou spelen. Hij is hiermede min of meer in overeenstemming met de onderzoeken van Collinson en Fowweather³⁹), die vonden dat alcalitoevoeging de reactiesnelheid verhoogt. Hij onderzocht varkens, waarbij een anaemie voorkomt door gebrek aan ijzer, welke soms gepaard gaat met icterus. Daarbij vond hij steeds een lage alcalireserve met een vertraagde reactie. Echter zijn de waargenomen uitersten der alcalireserve niet van dien

aard, dat zij voor een verandering der reactiewijze in aanmerking kunnen komen.

AD I. D. Binding van bilirubine aan een **onbekende stof** zou de directe reactie veroorzaken; in vertraagd serum zou bilirubine in colloïdale oplossing zijn. Deze meening wordt door Roberts¹⁶⁸⁾ naar voren gebracht. Alcohol toevoeging zou de binding verbreken en het bilirubine in den vorm van een zout, waarschijnlijk het natriumzout, brengen.

AD I. E. In een latere publicatie legt Roberts¹⁶⁹⁻¹⁷⁰⁾ verband tusschen de directe reactie en het **phosphatase**-gehalte van het bloed, dat hoog zou zijn bij afsluitingsicterus met directe reactie, minder hoog bij infectieuzen icterus met directe of biphasische reactie, laag bij haemolytische anaemieën met vertraagde reactie. Hieruit kan een samengaan van directe reactie en hoog phosphatase-gehalte blijken, een verklaring wordt er niet door gegeven.

AD I. F. De **toestand en hoeveelheid der eiwitten** zouden van invloed zijn op de wijze van reactie. Deze meening is het eerst geopperd door Adler en Strausz²⁾, die meenden te kunnen aantonen, dat de diazoreactie sneller verliep bij vermindering van het globuline- t.o.v. het albumine-gehalte, zooals bij retentie-icterus het geval zou zijn. Bij vertraagd reagerende sera is de verhouding normaal.

Deze conclusies hebben sterke tegenspraak uitgelokt.

Acél en Goldgrüber konden in een nauwkeurig onderzoek den invloed der globuline-concentratie niet bevestigen, evenmin als Dominici en Marengo⁴²⁾, Takashita¹⁹¹⁻¹⁹²⁾, Steinbrücke¹⁸⁷⁾, Rusnyak¹⁷⁶⁾, Fillinski⁵⁵⁾, Jourdain¹⁰⁹⁾, Lewin (naar Jourdain).

Jourdain zag o.a. een vertraagde en een directe reactie in twee sera die, wat quantitatieve eiwitsamenstelling betrof, gelijk waren.

Gertrud Lewin¹⁰⁹⁾ zag directe reactie in sera met opvallend veel globuline.

Bendien en Snapper¹⁸⁾ toonden aan, dat de wijze van reageeren niet afhankelijk kon zijn van de verhouding der eiwitfracties. Een ultra-filtraat, dat zoowel eiwit als bilirubine bevatte, reageerde geheel hetzelfde als het serum, waaruit het vervaardigd was, niettegenstaande de hoeveelheid eiwit sterk verminderd en de verhouding der fracties geheel anders geworden was.

Behalve aan het gehalte der globuline kennen Adler en Strausz nog een rol toe aan den zwellingstoestand der eiwitten. Die ingrepen of stoffen, welke de serumcolloïden doen zwellen, zouden de diazoreactie vertragen, omgekeerd versnellen ontzwelkende invloeden. Dezen zwellingstoestand der eiwitten bevorderen volgens Adler en Strausz koude, koolzuurverzadiging, de anionen der electrolyten van het voorste deel van de rij van Hofmeister, natriumrhodanaat, kaliumjodide, natriumjodide, kaliumbromide, natriumbromide, kaliumnitraat, natriumnitraat, kaliumchloride, natriumchloride, natriumchloraat, ammoniak, een weinig zuur of base, gelatine, gummi arabicum, glycerine, cholesterine.

De zwellingstoestand der eiwitten wordt verminderd volgens Adler en Strausz²⁾ door warmte, zuurstofverzadiging, de anionen van het achterste deel der rij van Hofmeister, natriumtartraat, natriumcitraat, natriumacetaat, natriumphosphaat (natriumsulfaat heeft tegen de verwachting geen versnellende, doch vertragende werking), alcohol, aether, aceton, chloroform, benzylbenzooat, diuretica der coffeinegroep (met salicylaat en benzooat), ureum, salicylasnaticus, calciumchloride, novasurol.

Naar aanleiding van het werk van Adler en Strausz merken wij op, dat ongetwijfeld warmte de diazoreactie versnelt, terwijl koude verlangzaamt. Of dit echter afhankelijk is van den zwellingsgraad der eiwitten of van de versnelling, die temperatuurverhooging aan de meeste chemische reacties geeft, moet in het midden gelaten worden.

Voorts kunnen zuren of basen zeker versnellend of vertragend werken. Zoo versnellen zuren de direct reageerende sera, ver-

tragen de vertraagde. Omgekeerd versnellen alcalien de vertraagd reageerende sera en vertragen de directe.

Van dezen tegengestelden invloed van zuur en alcali op de directe en vertraagde reactie deelen Adler en Strausz niets mede.

Omtrent de electrolyten der Hofmeistersche rij kan verwezen worden naar wat in hoofdstuk VI werd meegedeeld.

Wij vonden een versnellende werking der zouten geheel in volgorde der lyotropereeks, althans in een gebied van pH 6 tot in de buurt van pH 4,5. Een invloed der eenwaardige kationen kon door ons niet worden vastgesteld.

De zeer sterke versnelling die Adler en Strausz zagen na fosphaat-, acetaat-, tartraattoevoeging, moet toegeschreven worden aan hun bufferende werking, waardoor het zuur van het diazoreagens grootendeels wordt geneutraliseerd, en aan hun zoutwerking (zie hoofdstuk IV en VI). Zeker hebben de colloïden van het serum iets te maken met de snelheid der diazoreactie.

De door Adler en Strausz waargenomen remmende werking van gummi arabicum konden wij niet zeker vaststellen. Glycerine versnelt de vertraagde reactie een weinig. De versnellende werking van alcoholen, aether, aceton en chloroform kon bevestigd worden. Wij vonden dezelfde werking bij een groot aantal andere oplossingsmiddelen (zie bladz. 92). De versnellende werking der diuretica kon bevestigd worden.

Echter meenen wij dat deze werking niet alleen te danken is aan een verandering van den zwellingstoestand der eiwitten, doch ook aan het bufferend vermogen dezer diuretica, welke zouten van zwakke zuren zijn.

De methodiek, die Adler en Strausz bij hun proeven toepasten, lijkt niet gelukkig. Zij stelden bij een direct reageerend serum met een stopwatch de kleurverandering vast; ieder die dit heeft geprobeerd, zal toegeven dat het zeer moeilijk is te bepalen na hoeveel seconden de eerste roode tint van azobilirubine te zien is; hoe dikkere lagen van de reageerende stoffen men bekijkt, des te sneller ziet men de kleurverandering, welke bij direct reageerend serum veelal zoo snel gaat, dat eenige secon-

den meer of minder (waarop het in de proeven van Adler en Strausz vaak aankwam) niet zijn vast te stellen.

Bij het nadoen van hun proeven hebben wij dan ook een contrôle laten meelopen, welke de te onderzoeken stof niet bevatte, waardoor de invloed dezer stof op de snelheid der reactie scherper aan den dag kwam. Het leek ons niet juist kunstmatig direct reageerend serum te bereiden door gal aan normaal serum toe te voegen, zooals Adler en Strausz dit veelal deden.

Indien proeven werden gedaan met direct reageerend serum, werd een diazoreagens met weinig sulfanilzuur gebruikt, waardoor de reactie langzaam verliep en vergelijking met de contrôle beter mogelijk was.

Als verdienste kan gezegd worden, dat zij den nadruk leggen op den colloidalen toestand van de serumeiwitten in verband met de snelheid der diazoreactie.

Hoewel de door hen aangevoerde bewijzen niet overtuigend zijn, moet toch wel erkend worden, dat er een kern van waarheid in schuilt. Men denke bijv. aan de versnellende werking van sommige zouten van de lyotrope reeks.

AD I. G. Een volgende theorie, die geopperd werd door Sofue⁸⁴⁾ en namens hem meegedeeld door Hayashi⁸⁴⁾ berust op de onderstelling dat de **stromata der roode bloed-lichaampjes** stoffen zouden bevatten, die direct reageerend serum remmen.

Volgens Sofue zouden deze stoffen uit de stromata te extraheren zijn met alcohol of chloroform. Zijn proeven werden door Hartog⁸⁵⁾ herhaald, doch de laatste kon de uitkomsten van Sofue niet bevestigen.

Sofue voegde aan direct reageerend serum, waaruit hij door lichtbestraling het directe bilirubine had verwijderd, bilirubine toe, afkomstig van patiënten met haemolytischen icterus. Ook het omgekeerde verrichtte hij, nl. aan serum van een patiënt met haemolytischen icterus, welks bilirubine hij door bestraling onwerkzaam gemaakt had, voegde hij bilirubine uit een direct reageerend serum toe. Hoe hij de twee bilirubine-modificaties

apart verkregen had, werd in zijn artikel niet meegedeeld. (Het zou wel van belang zijn te weten, hoe hij direct reagerend bilirubine heeft kunnen vrij maken.)

In deze proeven reageerde het vertraagde bilirubine, opgelost in het directe serum, direct; omgekeerd reageerde het directe bilirubine, opgelost in het vertraagde serum, vertraagd. Verder meent Sofue, dat de hoeveelheid bilirubine ook nog een rol speelt, zoodat serum met veel bilirubine naar directe, met weinig naar een vertraagde reactie zou neigen.

De Castro³²⁾ herhaalde deze proeven en zag, dat kleine hoeveelheden direct reagerend bilirubine opgelost in sera, afkomstig van patiënten met haemolytischen icterus of in normale sera, vertraagde reactie gaven; bij grootere hoeveelheden bleef de reactie direct.

Echter is het direct reagerend bilirubine, dat de Castro gebruikt, gal, wat allermint een zuivere stof genoemd mag worden. Bij toevoegen van het diazoreagens aan het serum-galmengsel, is het zeer wel mogelijk, dat hierbij alle galzure zouten als galzuur worden neergeslagen, waaraan zich het bilirubine hecht en zoo aan de reactie voorloepig onttrokken wordt. Ook is het nog de vraag of het bilirubine der gal en „direct reagerend” bilirubine uit serum dezelfde stof zijn. De proeven van de Castro zijn dan ook weinig bewijzend en werpen geen nieuw licht op het vraagstuk van het verschil tusschen directe en vertraagde reactie.

AD I. H. Het directe bilirubine zou vrij bilirubine zijn, terwijl het vertraagd reagerend bilirubine zou zijn gebonden aan een eiwit of een lipoied.

Deze theorie werd door Hijmans van den Bergh in zijn monographie geopperd. Hij onderstelde, dat het aan bilirubine gekoppelde eiwit bij vertraagd serum door de alcoholtoevoeging zou worden gepraecipiteerd; het zoo vrij gekomen bilirubine zou direct reageren, evenals het werkelijk directe bilirubine. Men kan ook aceton inplaats van alcohol gebruiken

(Lepehne¹²⁸), voor welk feit de verklaring dezelfde blijft.

Rosenthal en Holzer zijn ook de meening toegedaan, dat een eiwitkoppeling van grooten invloed is.

Brulé, Garban en Weissmann²⁹) komen op grond van hun onderzoek, o.a. over dialyse van direct en vertraagd reageerend serum, tot dezelfde conclusie. Zij meenen, dat het bilirubine van vertraagd reageerend serum niet door semi-permeabele membranen kan gaan, omdat het aangehechte eiwit het molecuul te groot zou maken. Het bilirubine van direct reageerend serum passeert volgens hen vaak wel, omdat dit niet aan een groot eiwitmolecuul gebonden is.

Blankenhorn en Hoover²⁶⁻⁹²) deden, zonder bekend te zijn met de proeven van Hijmans van den Bergh en de diazoreactie, experimenten omtrent de dialyse der sera. Zij dialyseerden sera, van retentie-icterus afkomstig, door collodium membranen tegenover water en zagen, dat van dit bilirubine een kleiner of grooter deel de membranen passeerde. Het serum van patiënten met haemolytischen icterus bleek geen galkleurstof te bevatten, die dialyseerbaar is. Ook zij meenden, dat het bilirubine, dat wij nu het vertraagd reageerend bilirubine zouden noemen, aan een eiwitfractie gebonden is.

Levie Crailsheim¹³³) kwam na een uitvoerig onderzoek tot het resultaat, dat vertraagd bilirubine aan het serum-eiwit gebonden is. Volgens hem bestaat er in het bloed een bilirubine-globuline complex. De lever zou dit complex splitsen en uit het eiwit en cholesterine de galzuren opbouwen, terwijl het nu vrij geworden bilirubine in de gal wordt uitgescheiden en in dezen vorm de directe reactie geeft. Dit laatste moet op een misvatting berusten, daar vrij bilirubine geen directe reactie geeft en men dus voor verklaring der directe reactie in gal iets anders noodig heeft, hetzij een ander soort bilirubine, hetzij de begeleidende stoffen van de gal.

In vitro trachtte Levi Crailsheim de splitsing te bewerken door het bilirubine-eiwit-complex in het serum aan de werking van maagsap of pepsine en zoutzuur bloot te stellen. Bij aldus behandelde vertraagde sera werd de reactie direct. Bovendien nam hij waar, dat hij meer bilirubine in het serum vond,

nadat dit met eiwitplitsende enzymen was behandeld, dan van tevoren.

Cholaemische verschijnselen zouden optreden doordat, het bilirubine-eiwit-complex bij galstuwning niet gesplitst kon worden. Indien het bloed plotseling overstroomd wordt met deze stof, zouden de galvergiftigingsverschijnselen optreden: bij haemolytische anaemieën gebeurt dit niet, daar de vermeerdering langzaam is gekomen en het lichaam zich gewend heeft aan dezen toestand.

Echter is bij galstuwning, waarbij cholaemie optreedt, de diazo-reactie steeds direct, niettegenstaande hier dus de door Levi Crailsheim noodig geachte afbraak van het bilirubine-eiwit-complex nog niet heeft plaats gevonden.

Verder geeft hij met zijn theorie ook een verklaring van het voorkomen der directe reactie bij ziekten met leucocytose. De groote hoeveelheid proteolytisch enzym, die bij deze ziekten in het bloed aanwezig is, zou de oorzaak zijn dat reeds in de bloedbaan de splitsing van het bilirubine-eiwit-complex plaats vindt.

Naar aanleiding van dit laatste merkt Hartog op, dat de directe reactie, die bij sepsis kan voorkomen, ook door leverbeschadiging zou zijn te verklaren.

Dergelijke proeven als Levi Crailsheim deed Andrews⁸⁾, die echter geen directe reactie zag optreden na behandeling van vertraagd serum met pepsine.

Indien wij zelf papayotine gebruikten, zagen we nooit de reactie direct worden, integendeel werd de vertraging nog duidelijker. Na alcoholtoevoeging aan de gedigereerde vloeistof bleek de aanwezige bilirubinehoeveelheid niet veranderd.

De theorie van Levi Crailsheim wordt o. i. slecht door waarnemingen en feiten bevestigd en bevat zeker een groot speculatief element.

De Michaeli¹⁴⁴⁾ vermoedt, dat het vertraagde bilirubine in het serum aan eiwit gebonden is en dat voor deze binding zoowel de concentratie van het bilirubine als de tijd voor de binding beschikbaar, een rol spelen; komen er plotseling groote

hoeveelheden bilirubine in circulatie, dan is volgens hem de reactie direct.

Evenwel viel het Hartog op, dat bij lang bestaande levercirrhose, waar voortdurend betrekkelijk groote hoeveelheden bilirubine in het bloed aanwezig zijn, welke hoeveelheden van dezelfde orde zijn als die bij den haemolytischen icterus, de reactie steeds direct is.

Een ander bezwaar tegen de meening van de Michaeli is o.i., dat bij menschen, die bij bepaalde ziekten als bijv. cholelithiasis, een voortdurend slechts licht verhoogd bilirubinegehalte van het serum hebben, niettemin dit bilirubine een directe reactie geeft. Toch zijn hier de voorwaarden, die de Michaeli stelt om een vertraagde reactie te verkrijgen, aanwezig, lang verblijf in de bloedbaan en geringe concentratie van de galkleurstof.

Ook Piotrowski¹⁵⁸⁻¹⁵⁹⁾ onderstelt, dat het vertraagde bilirubine aan eiwitten gebonden is. Volgens hem is deze binding afhankelijk van de verhouding van bilirubine en beschikbaar eiwit. Afwijkend van Adler en Strausz stelt hij niet alleen de verminderde eiwithoeveelheid voor de directe reactie aansprakelijk, doch ook de plotselinge vermeerdering der hoeveelheid galkleurstoffen. Wat betreft den invloed der hoeveelheid eiwit op het al of niet direct zijn der reactie, kunnen wij verwijzen naar de onderzoekingen van Acèl en Goldgrüber, Jourdain, Takashita enz.

Feigl en Querner⁵⁴⁾ merkten in hun studie over het bilirubine terloops op, dat het vertraagd reageerend bilirubine aan een lipoied gebonden zou kunnen zijn. Meer dan een onderstelling is dit blijkbaar niet.

Mc Nee¹⁵⁹⁾ meent, dat direct reageerend bilirubine bestaat uit alcalibilirubine, dus een bilirubinaat; vertraagd reageerend bilirubine zou een eiwitbinding bezitten.

Het feit, dat vertraagd bilirubine in chloroform oplosbaar is, was voor Andrewes⁸⁾ een reden om de eiwitbinding te verwerpen, daar hij zich niet voor kon stellen, dat een eiwit in chloroform een heldere oplossing zou geven. Tegen de lipoiedtheorie van Feigl en Querner brengt hij te berde, dat hij

in chemisch zuivere bilirubine, hetwelk vertraagd reageert, geen phosphor kon aantoonen. Hij meent dan ook, dat een lipoïed, althans een phosphatidbinding voor de verklaring der vertraagde reactie niet in aanmerking komt.

Weltmann en Hückel²⁰¹⁾ verwerpen de eiwitbinding. De theorie van de binding van vertraagd bilirubine aan eiwit heeft zich zeer veel aanhangers verworven.

De meeste voornoemde schrijvers gaan uit van het feit, dat na praecipitatie van het eiwit in een vertraagd reageerend serum door alcohol het overblijvende alcoholische filtraat direct reageerend bilirubine bevat, zoodat na de verwijdering van het eiwit de twee bilirubinesoorten gelijk reageerend geworden zijn. Echter zijn er redenen om te onderstellen, dat dit alcoholisch filtraat van vertraagd reageerend serum bilirubine in andere omstandigheden bevat, dan het alcoholisch filtraat van direct reageerend serum.

Indien men nl. van deze twee soorten alcoholische filtraten een gelijke hoeveelheid in twee buizen doet, hierbij gelijke hoeveelheden chloroform voegt en daarna evenveel water in de buizen brengt, ziet men, dat in de buis afkomstig van het direct reageerende serum het bilirubine grootendeels in de alcohol-waterlaag blijft zitten, terwijl bij het vertraagd reageerend serum de bilirubine reeds bij weinig water grootendeels in de chloroformlaag overgaat. Men mag hieruit afleiden, dat het direct reageerend bilirubine gemakkelijker in verdunden alcohol in oplossing blijft dan in chloroform; bij het vertraagd reageerend bilirubine is het omgekeerde het geval. Het is niet zóó, dat er van het directe filtraat niets in de chloroform oplost en dat van het vertraagde filtraat alle bilirubine in de chloroform overgaat, maar er is wel verschil in oplosbaarheid waarneembaar.

Een ander argument tegen de theorie, dat de twee vormen van bilirubine dezelfde stof zijn, al of niet aan eiwit gebonden, is o.i. het volgende:

Indien men een alcoholisch filtraat van direct reageerend serum, verkregen door het samenbrengen van 1 volume serum met 2 volumen 97 % alcohol, met water 20—50 of meer malen verdunt, blijft de reactie van dit zeer weinig alcohol bevattend

filtraat direct. Indien men dezelfde proef doet met vertraagd reageerend serum blijft de reactie vertraagd tot zij negatief is geworden.

Uit proeven, door ons gedaan om na te gaan, welke alcoholconcentratie bij vertraagd reageerend serum nog een directe reactie opwekt, bleek ongeveer 20 % de grens te zijn, waar beneden de reactie zeker vertraagd werd. Hoe lager de alcoholconcentratie werd, des te langzamer verliep de reactie.

Hieruit zou af te leiden zijn, dat vertraagd reageerend bilirubine en direct reageerend bilirubine toch niet identiek geworden zijn, na praecipitatie van het grootste deel der eiwitten; zij blijven zich onderscheiden door hun verschil in snelheid van diazoteering. Misschien zet alcohol in zekere concentratie (tussen 66 % en 20 %) het vertraagd reageerend bilirubine om in een andere stof, welke direct reageert; deze omzetting zou dan reversibel moeten zijn, aangezien na watertoevoeging het gevormde direct reageerende bilirubine weer in vertraagd reageerend wordt omgezet. Indien men daarna de alcoholconcentratie opnieuw verhoogt, blijkt de reactie van het bilirubine-alcohol-water-mengsel boven een zekere grens opnieuw direct te worden. Met den zuurgraad der oplossingen staat dit niet in verband, zooals uit proeven bleek. Hierbij werd het alcoholgehalte van het bilirubinebevattend filtraat gewisseld. De hoeveelheid toegevoegd diazoreagens was constant, evenals het totaal volume der vloeistof, terwijl de snelheid van reactie wisselt van langzaam tot zeer snel. Bij zekere alcoholconcentratie lijkt dus het vertraagd reageerend bilirubine omgezet in het directe, in sterk zuur milieu prompt reageerende, bilirubine.

Ook uit deze proef blijkt, dat niettegenstaande het eiwit vrijwel geheel verwijderd is, het vertraagd reageerend bilirubine zijn eigenschap heeft behouden, vertraagd te reageeren. Wij meenen dan ook op grond hiervan de theorie, dat beide bilirubinesoorten dezelfde stof zijn, waarbij het verschil der twee vormen ontstaat door het al of niet gebonden zijn aan eiwit, als te simplistisch te moeten afwijzen. Een verklaring, waarbij een lipoïed de rol van het eiwit overneemt, zou daarentegen niet

in strijd zijn met de door ons hierboven ontwikkelde argumenten, daar lipoïeden in alcohol oplosbaar kunnen zijn.

AD I. J. Monasterio¹⁴⁵⁾ acht de alcoholwerking, waardoor de vertraagde reactie direct wordt, een gevolg van de daarbij **ontwikkelde warmte**, die de oorspronkelijk vertraagde reactie sneller zou doen verlopen, daar ook vertraagd reageerend serum, met diazoreagens gemengd, door verwarming sneller gaat reageren. Deze theorie lijkt niet waarschijnlijk, daar de warmte, door alcoholtoevoeging verwekt, gering is, en men met veel sterker verhitten de reactie altijd nog niet direct maakt, doch hoogstens versnelt, en tenslotte men het alcoholische filtraat uren kan laten staan, vóór men diazo toevoegt, zoodat er in dat geval van een effect der warmteontwikkeling door de menging van alcohol en water geen sprake meer kan zijn. Wij meenen dan ook over deze theorie verder te kunnen zwijgen.

II. De volgende theorieën zijn opgesteld door onderzoekers, die meenen, dat direct en vertraagd bilirubine verschillende stoffen zijn:

AD II. A. Aschoff^{11, 12)} sprak van bilirubine I, dat overeenkomt met het vertraagd reageerende; over bilirubine II, dat overeenkomt met het direct reageerende. Hij stelt zich voor, dat in de levercellen II uit I gemaakt wordt. Een dergelijke meening is ook Elton⁴⁸⁾ toegedaan. Op zichzelf is dit mogelijk, maar het verklaart het verschil niet.

AD II. B. Grunenberg⁷²⁻⁷⁴⁾, die het eerst waarnam, dat vertraagd bilirubine oplosbaar is in chloroform, onderstelt dat de twee reactie-modificaties van bilirubine veroorzaakt worden door **twee verschillende ammoniumzouten** van het bilirubine, een mono- en een di-ammoniumzout. Hij beroept zich hierbij op de waarneming van Küster^{122, 123, 124)}, dat er twee ammoniumzouten van bilirubine zouden zijn, het eene in chloroform oplosbaar, het andere niet. Hieruit leidt Grunenberg af, dat het

in chloroform oplosbaar vertraagde bilirubine, het in chloroform oplosbare ammoniumbilirubinaat van Küster is.

Hiertegen zijn eenige bezwaren in te brengen, deels dezelfde, die wij later zullen ontmoeten tegen de meening van Collinson en Fowweather.

Als beide bilirubine-zouten ammoniumzouten zijn (dus bilirubinen), zou door zuurtoevoeging het vrije bilirubine, dat een zwak zuur is, vrij gemaakt worden. Zuivere bilirubine reageert niet direct met het diazoreagens. Door aan een vertraagd of direct reageerend serum zuur toe te voegen, zouden beide dus een negatieve diazoreactie moeten krijgen. Nu wordt vertraagd reageerend serum door toevoeging van extra zuur wel geremd, echter wordt direct reageerend serum door toevoeging van zuur eerder sneller.

AD II. C. Beide bilirubines, verschillende stoffen zijnde, zijn aan eiwit gebonden.

Deze meening zijn Forrai en Sivo⁶²⁾ toegedaan. Zij zagen bij ultra-filtratieproeven met de verschillende sera, dat beide bilirubinen niet ultrafiltreerbaar waren, zolang de filters geen eiwitten doorlieten; ook de bilirubine uit de gal was niet ultrafiltreerbaar. Uit galkleurstof bevattende urine, evenals uit bilirubinaatoplossing passeerde de bilirubine de membranen. De passage door de membranen in de twee laatste gevallen is volgens hen te danken aan het ontbreken van eiwit in de oplossing. Zij konden, uitgaande van de onderstelling der eiwitbinding en zich baseerende op de ontzwellende werking op eiwitten, die Adler en Strausz voor het natriumbenzoicum cum coffeino hadden gevonden, door toevoeging van deze stof het bilirubine van direct en vertraagd reageerend serum ultrafiltrabel maken.

Gebruik makende van dialyse inplaats van ultrafiltratie, gelukte het ons niet deze resultaten te bevestigen. Na toevoeging van benzoas natrius bleef het bilirubine van direct en vertraagd reageerend serum ondialyseerbaar. Overigens gelukte het ons evenmin om bilirubinaatoplossingen door perkament hulzen te dialyseren.

Dat beide bilirubinesoorten gebonden zijn aan eiwit en wel aan

het albumine, wordt door Bendien en Snapper ondersteld. Deze zagen dat bij ultrafiltratie het bilirubine, van welk serum ook afkomstig, de collodiummembraan niet passeerde. Eerst indien de filters doorlaatbaar werden voor een weinig eiwit, passeerde bilirubine van beide modaliteiten de membraan.

Aangezien door het filter relatief grooter hoeveelheid albumine dan globuline ging en het percentage der doorgelaten albumine en bilirubine ongeveer even groot waren, meenen zij, dat de bilirubine aan de albumine-fractie gebonden is. Zij konden door deze proeven de theorie van Adler en Strausz, dat de soort van reactie verband houdt met de verhouding der eiwitfracties, ontzenuwen. Het albumine-globuline-quotient in hun filtraat was steeds geheel anders dan in het oorspronkelijke serum en sterk ten gunste van albumine verschoven. Toch bleef de reactie van het filtraat dezelfde als in het serum binnen de huls. Volgens de theorie van Adler en Strausz zou dit niet het geval hebben moeten zijn (zie bladz. 65). Naast vele andere argumenten zijn de bevindingen van Bendien en Snapper een belangrijke weerlegging van een deel der meeningen van Adler en Strausz.

Bennhold¹⁹⁻²⁰⁻²¹⁾ kwam o.a. op grond van kataphoreseproeven tot de conclusie, dat zoowel direct als vertraagd bilirubine aan de albumine-fractie der eiwitten gebonden is en in het geheel niet aan de globuline.

Bij praecipitatie der globulinen met ammoniumsulfaat blijft de bilirubine in de albumine-fractie geheel in oplossing.

AD II. D. de Castro³¹⁻³²⁾ meent, dat het directe bilirubine gevormd wordt uit het vertraagde als schakel in de keten van verbindingen bij afbraak van haemoglobine. **Het directe zou een lichte oxydatietrap zijn van het vertraagde.** Argumenten voor deze meening geeft de Castro niet.

Het mocht ons niet gelukken om door sterkere of mindere oxydatie (o.a. nitriet-zoutzuur, waterstofsuperoxyde) van vertraagd bilirubine een direct reageerend pigment te verkrijgen.

AD II. E. Davies en Dodds⁴¹⁾ beschouwen het ver-

traagde bilirubine als een oxydatieproduct van het directe, doch zeggen niet uitdrukkelijk, dat het biliverdine is. Eenige van de waarnemingen en proeven, die hen tot deze meening brachten volgen hier.

Het was bekend, dat patienten met een obstructie-geelzucht, wier serum direct reageerend bilirubine bevatte, na lang bestaan van de icterus soms een groenachtige huidtint hadden; het serum van zulke patienten had ook veelal iets groenigs. Zij beschouwen deze groene kleurstof als een oxydatieproduct van bilirubine.

Indien zij direct reageerend bilirubine met een weinig waterstofsuperoxyd behandelden, veranderde de kleur van de oplossing terstond in smaragdgroen. Deze groene vloeistof gaf zonder méér géén, doch te zamen met alcohol wél een directe diazoreactie. Dezelfde groene kleur konden zij verkrijgen door direct reageerend bilirubine te schudden met een emulsie van gewassen roode bloedlichaampjes; ook dan werd blijkbaar de galkleurstof geoxydeerd. De directe reactie was verdwenen en had plaats gemaakt voor een vertraagde. Na alcoholtoevoeging trad de reactie prompt op.

In het lichaam, meenen zij nu, oxydeeren de roode bloedlichaampjes het directe bilirubine tot vertraagd bilirubine. In normaal bloed en bloed van haemolytische anaemie, waar steeds vertraagd reageerend bilirubine aanwezig is, zou het oorspronkelijk aanwezig zijnde bilirubine door de erythrocyten zijn geoxydeerd tot een vertraagd reageerend pigment. Bij stuwingsicterus zou dit niet het geval zijn, aangezien daar te veel bilirubine aanwezig was om geheel geoxydeerd te worden.

Tegen deze theorie zijn eenige bezwaren. Serum afkomstig van een patient met een haemolytische anaemie, is niet groen van tint. Door waterstofsuperoxyd 3% konden wij geen groen pigment in direct serum onmiddellijk verwekken, wat Davies en Dodds aangeven dat wel het geval is; wel gelukte het bij toevoeging van een weinig zuur. Zeer lang bestaande lichte mechanische icterus behoudt een directe reactie.

Wij interpreteren ons inziens de proef van Davies en Dodds het best in dezen zin, dat het mogelijk is door voor-

zichtige oxydatie het direct reageerende bilirubine over te voeren in een groene verbinding, die met diazoreagens reageert als vertraagd bilirubine, maar dit niet is.

AD II. F. Weltmann en Hückel ^{201,202}) kwamen tot de conclusie, dat het verschil tusschen direct en vertraagd reageerend bilirubine hierin bestaat, dat **vertraagd** bilirubine voor omzetting **veel nitriet** noodig zou hebben, terwijl **zoutzuur remmend zou werken**. Het **direct** reageerend bilirubine daarentegen had vrij **weinig nitriet** noodig en **van zoutzuur minder last**.

Met verwijzing naar het hoofdstuk over nitriet (II) zouden wij deze meening als volgt willen corrigeren.

De hoeveelheid nitriet speelt slechts in zooverre een rol, dat een vermeerdering de hoeveelheid diazoniumverbinding verhoogt en deze laatste de versnelling der reactie bewerkt; deze versnelling is vooral duidelijk bij het vertraagd reageerend bilirubine, is evenwel ook bij het directe bilirubine aantoonbaar. Het zoutzuur wordt bij het vertraagde bilirubine slechts in geringe hoeveelheid verdragen. Het directe bilirubine reageert er sneller door en verdraagt hogere concentratie ervan.

AD II. G. Collinson en Fowweather ³⁹) onderstelden, dat het **direct** reageerend bilirubine een **ammoniumzout** zou zijn van bilirubine; het **vertraagd** reageerende zou **in colloïdale oplossing** verkeerend bilirubine zelf zijn.

Zij vormden uit bilirubine een ammoniumzout, dat de directe reactie gaf. Echter zal het milieu, waarin zij de reactie deden, wel te alcalisch zijn geweest, anders is dit niet mogelijk. Volgens onze ervaring geeft bilirubine, opgelost in een spoor ammoniak, geen directe reactie.

Collinson en Fowweather maakten bilirubine uit galsteen, dat in chloroform goed oplosbaar was, minder in alcohol, onoplosbaar in water; het alcalizout was onoplosbaar in alcohol en oplosbaar in water. Het bleek hun, dat bilirubine goed oplosbaar was in alcohol 60 %. In water gesuspenderd, reageerde bilirubine zéér traag of niet met diazoreagens. In 60 % alcohol trad prompt reactie op. De alcalizouten in water opgelost gaven

eveneens een prompte reactie. Met ammoniak gaf bilirubine, nadat het met diazo gemengd was, een directe reactie. Steun voor hun opvatting putten zij uit het feit, dat de gal meer ammoniak bevat dan het bloed, verder dat de alcaliciteit van serum voldoende is om het bestaan van ammoniumzouten van het bilirubine mogelijk te maken en ten slotte dat in vitro bij verwarming van direct reageerend ammoniumbilirubinaat de reactie indirect wordt, waarbij volgens hen ammoniak zou verdwijnen.

Newman¹⁵³⁾ maakte opmerkzaam, dat, indien men aan vertraagd reageerend serum, gemengd met diazoreagens, een weinig ammoniak toevoegt, men niet de kleur van het azo-bilirubine ziet optreden, doch een kleur, die gevormd wordt, ook indien men diazoreagens en ammoniak zonder bilirubine tezamen brengt. Ook Hunter⁹⁴⁻⁹⁵⁾ had dit opgemerkt.

Een bezwaar dat Roberts¹⁶⁸⁾ tegen de ammoniumzout-theorie te berde brengt is, dat, indien direct reageerend bilirubine een ammoniumzout is, dit na toevoeging van zoutzuur omgezet moet worden in bilirubine, dat een zwak zuur is. De diazo-reactie zou dan vertraagd moeten worden en een in chloroform oplosbaar pigment ontstaan. De reactie wordt echter, indien men zoutzuur aan direct reageerend serum toevoegt, niet vertraagd.

Verder zou ammoniumbilirubinaat, bij normaal serum gevoegd, volgens Collinson en Fowweather een directe reactie geven; dit is echter geheel niet het geval.

AD II. H. Newman¹⁵³⁾ veronderstelt, dat **direct** reageerend bilirubine **mononatriumbilirubinaat** is. Het bezwaar van Roberts tegen de theorie van Collinson en Fowweather geldt ook voor een natriumzout, nl. dat door zuur maken de reactie van direct reageerend serum vertraagd zou moeten worden, wat niet het geval is.

Newman acht het **vertraagd** reagerende bilirubine nauw verwant aan **het vrije zuur**, maar meer bestendig zuiver bilirubine zou als zoodanig volgens hem niet in het bloed kunnen circuleeren, daar het dan in direct reageerend pigment wordt omgezet. Hij komt tot het volgende schema van de bilirubines.

A. Het vrije zure bilirubine. Ontstaat door aanzuren van B, C en D; geeft een vertraagde reactie met een blauwachtige kleur, vormt gemakkelijk zouten en wordt snel geoxydeerd.

B. Vertraagd reagerend bilirubine in normaal serum en in serum van patiënten met haemolytische anaemieën. Het ontstaat uit A of C door bewaren der oplossing in serum in een zuurstof-vrije atmosfeer, is oplosbaar in chloroform en colloidaal in water; het geeft een vertraagde reactie met rose kleur.

C. Mononatrium-bilirubinaat. Het komt voor in serum van obstructie-icterus en in de gal, is oplosbaar in water, niet in chloroform, geeft een prompte reactie met rose kleur. Zet zich om in A door zuren, in B door bewaren in serum.

D. Dinatrium-bilirubinaat, komt in de natuur niet voor: het ontstaat uit A, B of C door overmaat van loog; is oplosbaar in water, niet in chloroform.

Kerppola en Leikola¹¹³⁾ meenen, dat in sera van haemolytische anaemieën het bilirubine als vrij zuur, bij obstructie-icterus als alcalizout voorhanden is.

De directe reactie wordt gegeven door alcali-bilirubine, de indirecte reactie (dus bijv. na alcoholtoevoeging) door alacali-bilirubine en het vrije zuur.

Toch meenen zij, dat de lichaamsvloeistoffen nog andere stoffen bevatten, waarvan sommige de diazoreactie geven, andere deze remmen.

Al deze theorieën, die onderstellen, dat ammonium- of natriumzouten de oorzaak zijn van de directe reactie, kunnen moeilijk juist zijn, op grond van de bezwaren die Morrell Roberts reeds noemde.

Ook kan men het feit niet wegcijferen, dat zuiver bilirubine, opgelost in een spoor alcali, zoodat er een bilirubinaatoplossing ontstaat, na diazo toevoeging geen of een uiterst trage reactie geeft; van een directe reactie is dan geen sprake.

AD II. J. Griffiths en Kaye ^{70,71,72)} komen met geheel andere meeningen. In hun eerste mededeeling vertellen zij een stof te hebben afgescheiden uit de gal, welke zij „direct reaction pigment” noemen; zij gedraagt zich als direct reageerend bilirubine en is niet het gewone vrije bilirubine uit den handel of een zout daarvan. Het koppelt met het diazoreagens in sterk zuur milieu. Volgens schrijvers is de stof onzuiver. Zij bereidden dit product door gal aan te zuren en daarna met chloroform te extraheeren, waarin de bilirubine overging en een weinig „direct reaction pigment”. Het in vacuo gedroogde residu bleek de directe reactie te geven. Het oxydeerde snel, werd sterk geadsorbeerd aan een eiwitpraecipitaat en koppelde met diazoreagens in vrij sterk zure omgeving.

Natuurlijk moest dit product nog veel onzuiverheden, o.a. de galzuren, bevatten.

In een latere publicatie van Griffiths ⁷²⁾ meent hij deze direct reageerende stof in zuiveren toestand geïsoleerd te hebben. De nauwkeurige beschrijving hoe de stof verkregen werd, leze men in de oorspronkelijke publicatie na. Hij komt door elementair-analyse tot de slotsom, dat de stof, die de directe reactie geeft, de samenstelling heeft $C_{32}H_{50}O_{11}N_2$.

Nu treft het bij de lezing van zijn publicatie, dat toevoeging van het zure diazoreagens aan de zoo zuiver mogelijke stof een troebeling gaf, die afkomstig kan zijn van galzuren, die nog steeds in het product zitten. De stof, waarmee hij extraheert is 80 % aceton, waarin galzure zouten echter ook oplossen. Zijn verdere zuiveringsmethoden geven geen waarborg, dat er geen galzure zouten in de extracten mee overgaan.

De juistheid van de elementair-formule blijkt dan ook aan twijfel ontleven. Het smeltpunt der stof was onscherp 142-150°.

Indien men volgens onze ervaring gal samenbrengt met het 10-voudige volumen zuivere aceton, het neerslag affiltreert en de doorgeloopte vloeistof, die dus een 90 % acetoplossing is, indampst, verkrijgt men een pigment, dat wel is waar snel reageert, doch steeds nog galzure zouten bevat, zooals blijkt uit de belangrijke troebeling, die na toevoeging van zuur ontstaat. Het zoeken naar een methode om het direct reageerende bili-

rubine vrij van galzuren af te scheiden, heeft ook ons geen resultaat opgeleverd.

Griffiths en Kaye openen een nieuwe mogelijkheid. Zij komen uitdrukkelijk tot het resultaat, dat het direct reagerende bilirubine een geheel andere stof is dan het vertraagd reagerende en geven daar dan ook zelfs een formule voor aan, die belangrijk grooter atoomaantal heeft dan die van het zuivere bilirubine. Verder zou het vertraagd reagerende bilirubine in colloïdale oplossing verkeerden.

In het hoofdstuk „eigenschappen van bilirubine” worden bij de bespreking van de dialyse nog eenige bezwaren geopperd tegen de samenstelling der stof, welke door Griffiths geïsoleerd en identiek gesteld werd met direct reagerend bilirubine.

AD II. K. Scott Fowweather⁶⁵⁾ toonde aan, dat de zouten van het bilirubine niet steeds een directe reactie geven. Hij meent dat door de lever uit het vertraagde „bilirubine a” het directe „bilirubine b” gevormd wordt; dat laatste vormt zouten.

Bij mechanischen icterus zou het zout van b in het bloed circuleeren. Hij beschouwt het bilirubine a als een **keto-verbinding**, terwijl het bilirubine b een **enol-verbinding** zou zijn. Hij is dezelfde meening toegedaan als Küster. Oplossing in alcohol zou het ontstaan van den enolvorm bevorderen. Ook Scott Fowweather neemt dus aan, dat de twee verschijningswijzen van bilirubine te danken zijn aan een klein verschil in chemische samenstelling, een onderstelling, die, echter zonder nader onderzoek, ook reeds door Hijmans van den Bergh in zijn monographie onder de oogen gezien is.

III. De derde groep van verklaringen van het verschil in reactiewijze van het direct en vertraagd bilirubine gaat uit van de onderstelling, dat het verschil afhankelijk is van de hoeveelheid galkleurstof in het serum.

De vertraagde reactie zou slechts gezien worden, indien het galkleurstofgehalte van het bloed laag was, of langzaam ontstaan.

Een dergelijke meening zijn Bensley^{22,23)}, de Micheli,

Piotrowski, Monasterio, Solito, Bargell en Bondi¹⁾ toegeedaan.

Hiertegen wordt opgekomen door Paterni en vooral Jourdain, die in zijn publicatie een reeks klinische waarnemingen naar voren brengt, die met deze meening in strijd zijn. Bij vele ziekten kan, hoewel er weinig galkleurstof in het bloed is, deze van het direct reageerend type zijn (bijv. galsteenen, levercirrhose). Omgekeerd kan het bij uitstek traag reageerende bilirubine van den haemolytische icterus in zeer groote quantiteiten in het bloed aanwezig zijn, bijv. 15 of 20 eenheden.

Ook Acèl en Goldgrüber, Hartog wijzen deze theorieën af.

Samenvattende zien wij dus, dat er geen gebrek is aan theorieën over het ontstaan der twee reactiewijzen. Uit deze menigte die te kiezen, welke ons het meest waarschijnlijk voorkomt, is zeer moeilijk.

Ofschoon geen van de vermelde theorieën bewezen mag worden geacht, meenen wij toch, dat er feiten pleiten voor de meeningen van Adler en Strausz, wel is waar in een anderen vorm dan zij haar opperden.

Onze eigen inzichten omtrent het wezen der directe en vertraagde reactie zullen wij nu ontwikkelen. Verder dan een werkhypothese konden wij het niet brengen. Veel en vakkundig colloïed chemisch onderzoek zal hier de oplossing kunnen brengen.

HOOFDSTUK IX

Een voorstelling omtrent het wezen van het onderscheid tusschen direct en vertraagd reagerend bilirubine.

Het zal onze volgende taak zijn, uit de voorafgaande gegevens ons een voorstelling te maken, hoe de diazoreactie op bilirubine in bloedserum verloopt en welke de verschillen tusschen direct en vertraagd reageeren zijn.

Deze voorstelling kan niet anders dan gebrekkig zijn. De colloïed-chemische opleiding van den medicus is immers niet van dien aard, dat hij één goed overzicht kan hebben van de zeer ingewikkelde toestandsveranderingen, die optreden bij de door ons genomen proeven, met een dergelijk gecompliceerd systeem als bloedserum. Hoewel dus een poging gedaan zal worden een verklaring in deze richting te zoeken, zal een nader onderzoek van colloïed-chemisch standpunt uit en met meer hulpmiddelen verricht, ter verkrijging van een definitieve oplossing, zeer gewenscht zijn.

Wij zullen beginnen onze aandacht te wijden aan de eigenaardigheid, die natriumbilirubinaat vertoonde. Wij zagen (bladz. 30), dat zonder het gebruik van buffer een prompte reactie optrad bij pH 3,7 en hooger, terwijl na toevoeging van buffer dit eerst bij pH 6,4 en hooger het geval was. Misschien hebben we de verklaring van dit verschil te zoeken in het verschil in oplosbaarheid van het bilirubine zelf, dat zich uit de zure vloeistof door zouten gemakkelijk laat uitzouten en zich daardoor aan de reactie onttrekt, terwijl bij afwezigheid van zouten dit bilirubine lang genoeg in oplossing blijft om met het diazoreagens te reageeren.

Omtrent den toestand in bloedserum zou men het volgende kunnen overwegen:

Het te voorschijn treden der lyotrope reeks der electrolyten bij grotere concentratie bij de snelheid van diazoteering van bilirubine in bloedserum, doet ons verband zoeken met den invloed dezer electrolyten op den solvaattoestand van een groot aantal colloïede systemen. Bij colloïed-chemische onderzoekingen werd namelijk gevonden dat, indien ten aanzien van welke physische grootheid ook, de lyotrope reeks voor den dag kwam - dit effect uiteindelijk terug te brengen was op den invloed der electrolyten op de colloïdsolvatatie. Met anders woorden, de reeks



geeft de volgorde aan, waarin de electrolyten met hetzelfde —ion en varieerend —ion in aequimoleculaire oplossing de zwelling respectievelijk den dispersiteitsgraad der colloïeden beïnvloeden. Altijd, althans in de meer geconcentreerde oplossingen boven $\pm 0,25$ N, werkt rhodaan het sterkst zwellingsbevorderend, het Cl het minst zwellingsbevorderend, in vele gevallen zelfs zwellingsremmend. Daar nu de volgorde, waarin de electrolyten in hoogere concentraties de bilirubinereactie tusschen pH 7 en pH 5,2 versnellen, identiek is met de reeks, die voor de zwelling van colloïeden door electrolyten gevonden wordt, lijkt het ons niet te gewaagd een verband te zoeken tusschen reactiesnelheid van het aanwezige bilirubine en den solvaattoestand der colloïeden in een serum. Wij denken ons een snellere reactie als gevolg van een hooger solvaattoestand der colloïeden, een vertraging treedt op, indien deze laatste afneemt.

Wanneer deze onderstelling de juiste is, dan kunnen we de probleemstelling omdraaien en in de snelheid der bilirubine-reactie een maat voor den solvaattoestand zien. Bilirubine zou dan slechts een indicator zijn voor den zwellingstoestand, door welke oorzaak ook veranderd, zoodat men bijv. door toevoeging van bilirubine aan een willekeurig serum en het daarna bepalen van de reactiesnelheid van het bilirubine een misschien in de pathologie belangrijk inzicht zou kunnen krijgen over den zwellings-toestand der colloïeden van dat serum. Hierbij werd dus verondersteld, dat er slechts één vorm van bilirubine bestaat in het

bloedserum, die zoowel bij direct als vertraagd reageerend serum aanwezig is.

Wij zullen nu nagaan, welke argumenten pleiten voor de opgeworpen stelling:

I. Is er maar één soort bilirubine?

Terwijl door verschillende onderzoekers, in de eerste plaats Hijmans van den Bergh en Fontaine Sluyters¹⁰²⁾ bilirubine uit directe zoowel als uit vertraagde sera bereid werd, maken zij geen melding van een verschil, dat tusschen bilirubine uit deze verschillende sera bereid, bestaat; het eindproduct was uit beide sera hetzelfde.

Muller en Engel¹⁴⁷⁻¹⁴⁸⁾ vonden spectroscopisch maar één soort bilirubine, zoowel in direct als vertraagd serum. Het azobilirubine, bereid uit direct en vertraagd serum, vertoont spectroscopisch geen verschil. (Peter¹⁵⁷⁾, Heilmeyer en Krebs⁸⁵⁾, Hijmans van den Bergh en Grotepass¹⁰³⁾.

II. Bepaalt de solvatatietoestand, respectievelijk de dispersiteitsgraad, den vorm der diazoreactie?

1°. Vertraagd reageerende sera zijn dikwijls iets opalescent, terwijl direct reageerende sera geheel helder zijn. P. Muller (mondelinge mededeeling) meent hierdoor vaak de directe en de vertraagde sera bij den eersten oogopslag te kunnen onderscheiden.

Naar analogie met het bekende verschijnsel, dat een sol bij verminderde stabiliteit in troebeling toeneemt, willen wij in dit optisch verschil tusschen direct en vertraagd reageerende sera een verschil zien in solvatatietoestand, respectievelijk dispersiteitsgraad. Hierin werden wij gesterkt door de waarneming, dat toevoeging van electrolyten aan een opalesceerend serum dit helder maakt en de reactie versnelt. Verder worden bij bewaren vertraagde sera sneller troebel dan directe, wat bij paarden-serum sterk tot uiting komt; de diazoreactie wordt daarbij trager.

2°. Terwijl bovenstaande waarnemingen zich tot visueele verschillen beperken, vonden wij ook analogieën daarvan in de

bilirubinereactie. Beide soorten serum lopen bij bewaren achteruit in reactiesnelheid. De vraag rijst of vermindering der hoeveelheid bilirubine hiermee verband houdt.

Lepehne en Hartog meenen, dat de totale hoeveelheid bilirubine afneemt bij bewaren van het serum; oxydatie zal hierbij wel een rol gespeeld hebben. Wij namen aan een sterk direct reageerend serum waar, dat de tijd, noodig om een totale omzetting teweeg te brengen, in zes dagen van 5 minuten was gestegen tot meer dan 15 minuten. Oxydatie had niet plaats gevonden, de totale hoeveelheid, gemeten met een methode welke geen neerslag vormt, was gelijk gebleven. Hier was dus de snelheid van omzetting minder geworden. O. i. een gevolg van de verminderde dispersiteit der colloïden.

Vele schrijvers (Andrewes, Lepehne, Mc Nee, enz.) wijzen op het trager worden der reactie, indien serum eenigen tijd gestaan heeft. Wij zagen lang bewaard paardenserum, waarin zelfs geen trage reactie meer was op te wekken indien men $\frac{1}{4}$ volumen diazoreagens toevoegde; slechts electrolyt kon de reactie op gang brengen. Dit serum was geruimen tijd bevroren geweest en daardoor grover dispers geworden.

Wij deden nog de volgende proef. Van paardenserum werd een deel eenige uren op 54° verhit (a), een tweede deel werd bij kamertemperatuur bewaard (b), terwijl een derde deel bevroren werd (c).

Nadat de serumporties weder op kamertemperatuur gebracht waren, bleek in doorvallend licht a helderder dan b, b een weinig helderder dan c, en met de loupe bezien bleek c wat grover troebel te zijn dan b.

De diazoreactie verliep bij pH 5.7 en pH 4.5 en pH 3.6 in a sneller dan in b, in b iets sneller dan in c.

Nu werden de drie serumporties lang in een hoekcentrifuge gedraaid, bij zeer hoog toerental, waarna zij alle drie helder waren geworden. Het verschil in diazoreactie was blijven bestaan: a reageerde duidelijk sneller dan b, c iets langzamer dan b.

Nu is er reden om aan te nemen dat colloïden niet ver van hun vlokkingstemperatuur fijner gedispergeerd kunnen zijn dan bij kamertemperatuur.

Wij willen de uitkomsten der vorige proeven dan ook zien als een uiting, dat het bilirubine bij fijnere dispersiteit der colloïeden sneller diazoteert dan bij grovere dispersiteit; het uiterlijk verschil der sera is hiernaar een aanwijzing.

3e. Indien door dialyse een gedeelte van de zouten uit het serum wordt verwijderd, waardoor de solvatatietoestand der colloïeden afneemt en partieele vlokking optreedt, neemt de snelheid der diazoreactie sterk af. Door toevoeging van kleine hoeveelheden electrolyt wordt de dispersiteitsgraad weer verhoogd en treedt reactieversnelling in. Indien men slechts zoolang dialyseert, dat nog geen vlokking ontstaat, is toch de reactie sterk vertraagd.

4°. Vermengt men een bilirubinaatoplossing met kippeneiwit, dan kan men door voldoende eiwit te gebruiken, een wijze van reageeren verkrijgen, die op de directe reactie lijkt (zie bladz. 43).

Een kippeneiwit-bilirubinaatmengsel, waaraan men een flinke hoeveelheid, de solvatatie verhoogende, rhodaankalium toevoegt, vertoont een snellere reactie dan de contrôle zonder zout. De oplossing, waaraan zout is toegevoegd, oxydeert snel en wordt hardgroen (via zacht smaragdgroen, zie bladz. 50). De contrôle zonder zout blijft daarentegen weken tot maanden lang geel van kleur, terwijl het bilirubine daarin aantoonbaar blijft. Dit is te meer merkwaardig, daar een waterige bilirubinaatoplossing vrij snel aan lucht en licht wordt omgezet.

Bij den hooger en solvatatietoestand wordt het bilirubine sneller van reactie en sneller oxydeerbaar. Deze eigenschappen hooren thuis bij de directe reactie. Het ziet er dus uit alsof het bilirubine geadsorbeerd is aan colloïdale partikels in de vloeistof, zoodat bij een verhoogde solvatatie respectievelijk hoogere dispersiteit en een daarvan het gevolg zijnde vergrooting van het totale oppervlak der colloïdale partikels het bilirubine een grooter reactie-oppervlak biedt, tot uiting komend in een snellere diazoteering en oxydatie.

5°. De invloed van stoffen, die de solvatatie verlagen, moet onderverdeeld worden in eenige groepen:

a. Stoffen als resorcine, hydrochinon, tannine, die in kleine

concentraties een desolvateerende werking op de colloïden uitoefenen. Zij vertragen de bilirubine-reactie duidelijk.

b. Stoffen, die zoowel de lading als de solvatatie beïnvloeden, als molybdeen-zuur, phosphorwolfräam-zuur, wolfräam-zuur, vana-dine-zuur vertragen de reactie of maken deze negatief. De doseering komt hierbij er zeer op aan, daar men bij te hooge concentratie praecipitatie van het eiwit krijgt.

c. Stoffen als alcohol en aceton. In tegenstelling tot de desolvateerende middelen sub a genoemd, werken deze stoffen versnellend. Wel is waar doen deze stoffen, in eenige concentratie aanwezig, de waterbinding der colloïden sterk afnemen, doch tegelijkertijd zijn zij een oplosmiddel voor bilirubine en geven daardoor reactieversnelling als „Mischlösungsmittel“ voor het diazoreagens.

Wanneer men de solvatatie-verlaging door de onder a en b genoemde middelen opheft door het sterk solvateerende rhodanide, wordt de reactie weer sterk versneld. Soms is iets extra diazo noodig, doch alléén kan dit de versnelling niet op gang brengen.

Konijnenserum, dat tegen paardeneiwit gerichte praecipitinen bevat, doet bij menging met paardenserum de reactie trager worden, terwijl dit nauwelijks het geval is met serum van niet voorbehandelde konijnen.

1 cc paardenserum + 0,2 cc praecipitine + 0,3 cc diazo reageert trager dan de contrôle zonder praecipitine. Bij andere pH dan hier gebruikt werd, is hetzelfde te zien.

6°. Indien men een ligatuur legt om den ductus choledochus van een konijn, neemt de hoeveelheid bilirubine in het bloed snel toe. Een prompte directe reactie treedt echter pas na langen tijd op; eerst is de reactie vertraagd, daarna biphasisch, dan direct.

Davies en Dodds vonden 20 uur na de operatie nog geen directe reactie, na 25 uur een spoor directe reactie, na 40 uur sterker direct, doch nog niet totaal; pas na 66 uur was er een prompte directe reactie.

Lepéhne vond een prompte directe reactie 24 uur na de operatie bij drie konijnen; een dezer reacties was biphasisch.

Een vierde dier gaf pas na 50 uur een trage biphasische reactie, het vijfde na 72 uur. Retzlaff¹⁶⁶⁾ zag hetzelfde.

Griffiths en Kaye zagen 24 uur na de ligatuur bij drie konijnen zwakke of geen directe reactie, bij vier andere dieren directe reactie; na 48 uur hadden alle dieren prompte directe reactie. De urine bevatte tevoren reeds galkleurstof.

Het wil ons voorkomen, dat door de stuwing dadelijk bilirubine in de bloedbaan gedreven wordt, dat echter voor de verandering der serumcolloïden (door de lever?) eenige tijd noodig is; ook het verloop van vertraagd via biphasisch naar direct wijst in deze richting. Als in het plasma de dispersiteit der colloïden hooger is geworden, wordt de reactie direct.

Al de voorgaande gegevens wijzen op een nauwe correlatie tusschen solvatatiegraad en snelheid van diazoteering. Vermin- dering van den solvaattoestand bleek identiek met een vertraagde reactie, vermeerdering der solvatatie met een versnelling.

In hoeverre passen nu de gegevens over den invloed der pH op de diazoteeringssnelheid van bilirubine in het genoemde schema? Vertraagde sera vertoonen immers in de buurt van pH 5 een maximale reactie-snelheid, hoewel ook dan de reactie in 't geheel niet direct is. Het zou van groot belang zijn indien aangetoond kon worden, dat dit punt samenviel met de hoogste solvatatie van het serum. Dit gelukte ons niet. Wel stelden wij vast, dat bij een bepaald paardenserum de pH de snelste diazoteering **niet** dezelfde was als de pH, waarbij serum de geringste stabiliteit heeft.

Daartoe werden in een aantal buizen met elk $\frac{1}{2}$ cc diazoreagens stijgende hoeveelheden loog gebracht en water tot constant volume; na menging werd aan alle buizen 1 cc paardenserum toegevoegd. De snelste diazoteering vond plaats bij pH 5,2.

Vervolgens werd dezelfde proef verricht, doch in plaats van diazoreagens werd diazo A gebruikt. Aan alle buizen werd vervolgens een gelijke kleine hoeveelheid alcohol toegevoegd. Wij gingen hierbij uit van de gedachte, dat de pH waarbij het serum het minst stabiel was, dezelfde zou zijn waarbij het het meest gevoelig zou zijn voor kleine desolvateerende invloeden.

Wij vonden nu, dat maximale alcohol-gevoeligheid, dus minimale colloïdale stabiliteit bestond van pH 4,7 tot pH 4,3, terwijl bij pH 5,2 de vloeistof volkomen helder was. Er kon dus bij deze proeven slechts aangetoond worden, dat de sterkste reactieversnelling niet plaats vond op het pH gebied van de minste stabiliteit. Deze proeven behoeven dus voorloopig niet in tegenspraak te zijn met de door ons geopperde zienswijze. Wel is een nader onderzoek met meer hulpmiddelen, waarmede men een inzicht in den colloïdalen toestand zou kunnen verkrijgen, zeer gewenscht (viscosimetrie? nephelometrie? interferometrie? enz.).

In het voorgaande hebben wij bij voortduring gesproken over serumcolloïden en niet over serumeiwitten. Onder serumcolloïden verstonden wij het totale uiterst gecompliceerde colloïde stelsel. Speciaal den laatsten tijd is er voortdurend de aandacht op gevestigd, dat verschillende colloïden niet noodzakelijk als aparte onderdeelen naast elkaar in een colloïde stelsel behoeven voor te komen, doch dat er onder gunstige ladingsomstandigheden zich colloïdale stelsels kunnen vormen, waarvan de solvatatie aanmerkelijk afwijkt van die van ieder der componenten afzonderlijk onder dezelfde omstandigheden (H. G. B u n g e n b e r g de J o n g Coacervaten).

In hoeverre in serum in bepaalde pH gebieden een dergelijk verschijnsel optreedt, blijft een open vraag, doch de mogelijkheid is niet uitgesloten, dat onder omstandigheden de lipoïedfractie en eiwitten met het bilirubine dergelijke stelsels kunnen vormen.

Misschien is een aanwijzing, dat lipoïeden in dit vraagstuk een rol spelen het volgende: Indien men vertraagd serum schudt met kleine hoeveelheden chloroform en daarna aan het mengsel een weinig, bijv. $\frac{1}{4}$ volume diazo toevoegt, ziet men een groote reactieversnelling. Hetzelfde is het geval met aether, benzol en andere lipoïedsolventia. Wordt door deze oplosmiddelen wellicht een lipoïedbinding in de sera losgemaakt?

HOOFDSTUK X

Quantitatieve bilirubinebepaling.

Het verlangen de hoeveelheid bilirubine in het bloed te kennen is de aanleiding geweest tot het uitwerken van methoden om het gehalte te meten. Verschillende principes zijn hiertoe aangewend, met meer of minder gunstig resultaat. Deze zijn:

I. Weging. Hammarsten⁷⁵⁻⁷⁶) kon op deze wijze het bilirubinegehalte van paardenserum bepalen. De methode is moeilijk en ongeschikt om kleine hoeveelheden galkleurstof te bepalen.

II. Oxydatie der bilirubine met een mengsel van salpeterzuur en salpeterigzuur. Er werd nagegaan, welke hoeveelheid bilirubine met dit oxydatiemiddel nog juist een groene of blauwe kleur gaf; deze grens werd nu gezocht door het te onderzoeken serum te verdunnen. De nog juist waarneembare reactie kwam overeen met de grens, die te voren met een bilirubine-eiwitmengsel bepaald was. De methoden zijn subjectief; waar de een nog een gekleurden ring ziet, neemt de ander niets meer waar.

Gilbert⁶⁷), die een dergelijke methode uitwerkte, meent dat de bilirubine aantoonbaar is in een verdunning van 1 : 40.000, Chabrol³⁴⁻³⁵) vond 1 : 50.000, Hannema 1 : 150.000

Herzfeld⁸⁷⁻⁸⁸) gebruikte als oxydatiemiddel Hammarstens reagens (salpeterzuur en zoutzuur), hij toonde 0,16 m.gr. % bilirubine nog aan. Hij acht de later te bespreken diazomethode niet specifiek voor bilirubine, omdat ook andere pyrrol derivaten de reactie zouden geven.

Frigyer⁶²) vond dat de diazomethode gevoeliger was, doch dat bij sterken icterus de oxydatiemethode betere uitkomsten gaf. De oorzaak hiervan zal de adsorptie van bilirubine aan eiwit bij de diazomethode zijn.

De oxydatiemethode werd ook gebruikt door de Castro³¹⁾, die met Sabatini's reagens (zoutzuur en natriumnitriet) werkte. Jendrassik en Czike¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾ vonden de getallen, die volgens de methode van Herzfeld de bilirubine-waarden aangaven, te hoog, omdat volgens hen de grenswaarde der bepaling door Herzfeld te hoog bepaald was.

De oxydatiemethode van Fouchet (ferrichloride op het serumpraecipitaat van trichloorazijnzuur) is betrekkelijk ongevoelig 1 : 15.000.

Ook de methode van Vogl en Zins¹⁹⁹⁾, die het praecipitaat der serumeiwitten, dat de galkleurstof meesleept, aan de lucht verwarmen, bleek aan Murakami en Nishida¹⁴⁹⁾ veel minder gevoelig dan de diazoreactie.

Het bezwaar der oxydatiemethoden is dus de geringe gevoeligheid en de onspecificiteit (zie bladz. 93), terwijl door het persoonlijke in de aflezing de uitkomsten van verschillende onderzoekers onderling moeilijk vergelijkbaar zijn.

III. Spectrophotometrische bepaling, òf van bilirubine (Yllpo²⁰⁹⁾, Mann en Bollman¹³⁵⁾, Muller en Engel¹⁴⁸⁾, Heilmeyer⁸⁵⁾, Grunenbergh⁷⁴⁾, Peter¹⁵⁷⁾; òf van het azobilirubine (Peter¹⁵⁷⁾, Heilmeyer en Krebs⁵⁵⁾. Waarschijnlijk zijn deze methoden nauwkeuriger dan de chemische bepalingen, doch haar ingewikkeldheid en de benodigde kostbare apparatuur maakten, dat ze geen algemeenen ingang hebben kunnen vinden. De gevonden hoeveelheden bilirubine zijn in het algemeen hooger dan die met de diazomethoden, speciaal wanneer men deze volgens Hijmans van den Bergh uitvoert.

IV. Bij de volgende methode wordt het bloedserum zoolang met water verdund tot nog juist een gele kleur zichtbaar is. De daarvoor noodige verdunning geeft een maat voor het galkleurstofgehalte in het bloedserum (Blankenhorn²⁶⁾). Ook deze methode is uit den aard der zaak zeer subjectief en heeft verder als bezwaar, dat andere serumkleurstoffen storend werken.

V. Meting van de sterkte der kleur van het serum òf van het plasma òf van het filtraat, verkregen door de serumeiwitten met het dubbele volume kleurloze aceton neer te slaan.

Meulengracht¹³⁹⁾ vergeleek de kleur van het eventueel verdunde serum met die van een kaliumbichromaatoplossing van bekende sterkte (1 : 10.000) en vond hierin een maat voor de bilirubinaemie. De methode is zeer eenvoudig en daardoor veel in gebruik gekomen.

Hijmans van den Bergh¹⁰²⁾ paste de methode toe om schattend te controleeren of de door middel der diazomethode gevonden waarden juist waren. Hij gebruikte een oplossing van kaliumbichromaat 1 : 3800, welke ongeveer dezelfde kleur had als die van een bilirubine-oplossing, welke 1 eenheid galkleurstof bevatte. Over de kleurgelijkheid, indien hij met serum vergeleek, was hij niet tevreden. In Amerika heeft deze methodiek, dank zij het werk van Bernheim²⁵⁾, veel ingang gevonden. Bezwaren tegen deze directe kleurvergelijking zijn:

- 1°. haemolyse van het serum bederft de kleur;
- 2°. sera bevatten naast bilirubine nog andere kleurstoffen en verschillen daardoor onderling iets in tint.

Voordeelen der methode zijn:

- 1°. de eenvoudigheid;
- 2°. het is niet noodig om, zooals bij de diazomethoden, een eiwitneerslag te maken, dat een deel van het bilirubine aan zich adsorbeert.

Walter gebruikte in plaats van bloedserum oxalaatplasma; men heeft dan minder last van haemolyse. Als vergelijkingsvloeistof gebruikt hij 10 cc kaliumbichromaat 1 : 10.000, waarbij gevoegd zijn 0,2 cc oplossing van orange-poirier 1 : 10.000.

Förster heeft getracht het bezwaar op te heffen, dat ge-haemolyseerd en opalescent serum niet vergelijkbaar waren met den standaard, door inplaats van met serum, te werken met het filtraat van serum en kleurlooze aceton. Het is daarbij mogelijk om te praecipiteeren met ruim 1 volume aceton op 1 volume serum. Het serum wordt op deze wijze weinig verdund, wat bij lage bilirubinewaarden voordeelen biedt. Echter lost in aceton ook de luteine op en wordt verder bij sommige sera een niet

onbelangrijk deel der bilirubine aan het eiwitpraecipitaat vastgekleefd en aan de bepaling onttrokken. Voor de sera, die weinig bilirubine van het vertraagde type bevatten, kan deze methode echter van voordeel zijn. Zij vindt in de kliniek nog al toepassing (von Bergmann, Eilbott).

VI. Methoden, die berusten op de diazoreactie. De voordeelen der bepaling met behulp der diazoreactie zijn:

- 1°. andere gele kleurstoffen in het serum versterken de kleur niet, zoals bij de directe vergelijking volgens Meulengracht wel het geval is;
- 2°. de reactie zou specifiek zijn voor bilirubine.

Dit werd tegengesproken door Herzfeld, die zeide met indol en scatol reactie te verkrijgen. Zijn bezwaar werd door Hijmans van den Bergh en Muller ontkend. Micheli en Greppi kregen echter met deze stoffen wel positieve reacties.

Andrewes⁹⁾ vond dat sera afkomstig van patiënten met uraemie met diazoreagens een vreemde bruine tint vertoonden, die met alcali rose werd, terwijl azobilirubine met alcali daarentegen groen wordt. De rose kleur ontstaat langzaam. Wij zagen eenige malen een gouden tint in het mengsel van alcoholisch filtraat van uraemisch serum en diazoreagens, die na verwarming door toevoeging van 40 % natronloog rood werd.

De z.g. „reactie van Andrewes”¹⁷⁾ werd door Harrison en Bromfield⁷⁸⁾ nader onderzocht, die een indoxylverbinding als de oorzaak beschouwden.

Een dergelijke reactie als Andrewes beschreef Chrometzka³⁸⁾.

Wij meenen, dat de „reactie van Andrewes” een bruikbare methode is om na te gaan of de uraemie een belangrijken graad bereikt heeft. Het was eenige malen mogelijk langs dezen weg een belangrijke uraemie te herkennen. Indien zij positief is, is volgens onze ervaring de indicanreactie met thymolspiritus en Obermayers reagens in het bloed steeds sterk verhoogd. Indien men de hier te lande nog weinig gebruikte reactie kent,

zal zij wel nooit veel last bij bilirubinebepaling veroorzaken.

W. Kerppola¹¹⁹⁾ meent, naast een reeks bezwaren tegen de methode van Hijmans van den Bergh, nog opmerksaam te moeten maken op een onbekende kleurlooze stof, die volgens hem de diazoreactie geeft en in serum voorkomt. De stof is door chloroform, benzol, toluol enz. extraheerbaar. Hij schudt 1 cc serum met 2 cc benzol gedurende 5 minuten; indien de benzol geel is, wordt deze met een alcohol-loogmengsel (1 deel 94 % alcohol en 4 deelen 10 % NaOH) geschud. De bilirubine die in de chloroform zat, gaat in de loog over, de kleurlooze stof blijft in chloroform; de helder geworden chloroform wordt gemengd met diazoreagens en alcohol.

$\frac{1}{2}$ cc chloroform + $\frac{1}{2}$ cc diazoreagens + 3,5 cc alcohol.

Er ontstond een heldere vloeistof, welke een roode kleur aannam.

De stof, die op deze wijze gediazoteerd werd, was kleurloos, oplosbaar in lipoiedoplosmiddelen, bestand tegen verhitten op 100 °, werd vernield door sterk zuur en sterke loog. Hij kon niet aangeven bij welke ziekte toestanden de stof voorkwam, doch wel dat ze zeer verbreid was.

Hij wijst dan ook alle methoden af, die de bilirubine door diazoteering willen meten en beveelt zijn eigen colorimetrische extractmethode aan, waarbij de kleurlooze stof niet stoort. Kerppola vergelijkt de bilirubinewaarden, volgens zijn methode verkregen, met de waarden, die volgens Heilmeyer photometrisch verkregen werden. Bij stuwing zijn hun uitkomsten ongeveer gelijk, bij dynamischen icterus vindt men volgens Heilmeyer te lage waarden. Ons ontgaat wat de reden is, dat Heilmeyer lage waarden vindt niettegenstaande hij de onbekende stof ook mede diazoteert. Men zou het omgekeerde verwachten.

Wij trachtten de kleurlooze stof welke Kerppola beschreef op het spoor te komen en onderzochten de sera van 3 normale menschen, 1 chronische nephritis, 1 anaemia perniciosa, 1 icterus catarrhalis, 3 patiënten met stuwingsicterus, 1 cirrhose van Laënnec, 4 paardensera. Nooit gelukte het ons in het eindextract een roode kleur, of in 't algemeen maar eenige kleur door diazo toevoegen te krijgen; wij deden de proeven met benzol zoo-

wel als met chloroform. Wel konden we een roode kleur krijgen indien bij het afpipetteeren der benzol een weinig bilirubine bevattende alcali werd meegenomen. Indien dit met zorg werd voorkomen, was nooit eenige roodkleuring te zien. We moeten nog opmerkzaam maken, dat wij eenige malen zagen, dat indien de alkalische alcohol bij het benzol- of chloroformextract werd gevoegd, een bruine of rose verkleuring optrad (dus zonder diazo-reagens), welke echter niet in de benzol-, respectievelijk chloroformlaag overging. Omtrent de oorzaak hiervan deden wij geen verdere nasporing.

3°. De groote gevoeligheid, die volgens Hijmans van den Bergh 1 : 1,5 miljoen bedraagt.

Hiertegen brengt Förster in, dat de roode kleur van het azobilirubine niet in grooter verdunning herkenbaar zou zijn dan de gele van bilirubine zelf.

Indien men gal steeds meer verdunt tot de gele kleur nog juist te zien is, zou volgens Förster⁶³⁾ na diazoteering de roode kleur niet meer worden waargenomen. Hij raadt dan ook een directe kleurvergelijking aan; ons leek deze waarneming van Förster juist.

Nadeelen zijn behalve de hierboven reeds aangeduide:

- 1°. de soms slechte vergelijkbaarheid van de eindkleur met die der standaardoplossing (cobaltsulfaat in water of ferri-rhodanaat in aether). Dit bezwaar vervalt, indien men azobilirubine als standaard gebruikt;
2. de bij de meeste methoden noodzakelijke sterke verdunning, die noodig is ter verkrijging der eindvloeistof. Sera die weinig bilirubine bevatten, kunnen hierdoor moeilijk quantitatief bepaald worden.

Bij de methoden die op de diazoreactie berusten, kan men twee typen onderscheiden:

- A. waarbij een eiwitneerslag wordt gevormd;
- B. waarbij de serumeiwitten niet worden geprecipiteerd.

AD A. De eerste, die de diazoreactie toepaste voor een quantitative schatting van bilirubine in een eiwithoudende vloeistof,

was H i j m a n s v a n d e n B e r g h ⁹⁶⁾. Zelf noemde hij zijn methode een schatting, overtuigd, dat in veel gevallen zich een deel der galkleurstoffen aan de reactie onttrok. Hij bracht 1 cc bloedserum samen met 2 cc alcohol 96 %. Het ontstane eiwit-neerslag werd afgecentrifugeerd, van de bovenstaande vloeistof werd 2 cc gemengd met 0,25 cc van het Ehrlichsche reagens. Indien dit mengsel troebel werd, voegde hij nog 0,5 cc alcohol toe, waarna de vetzuren, die de troebeling zouden veroorzaken, weer in oplossing gingen. Bij deze behandeling had hij het serum in totaal 4 maal verdund. De nu ontstane roode kleur vergeleek hij oorspronkelijk met de kleur, welke verkregen was door een bilirubine-oplossing van bekende sterkte te diazoteeren; een oplossing van 1 : 200.000 zuiver bilirubine noemde hij een Eenheid (E).

Reeds hier moet worden opgemerkt, dat door een fout, in de oorspronkelijke berekening geslopen, deze eenheid niet 1 : 200.000 was (zooals H i j m a n s v a n d e n B e r g h zeide), doch 1 : 250.000, zooals door H u n t e r ⁹⁴⁾ en R a b i n o w i t c h ¹⁶²⁾ lange jaren later werd opgemerkt. Alle waarden, verkregen met metingen, verricht volgens de methode van H i j m a n s v a n d e n B e r g h zijn daardoor ook 20 % te hoog uitgevallen. Daar zuivere bilirubine zeer duur en moeilijk te verkrijgen was, zag hij uit naar een vergelijkingsvloeistof, die eenvoudiger te verkrijgen en duurzamer was. Deze vond hij in een ferrirhodanaat-oplossing in aether, die echter door verdamping van het oplosmiddel geen constante kleursterkte had; slechts een dag was zij bruikbaar. De definitieve vergelijkingskleur vond hij in een oplossing van cobaltsulfaat in water (2 gr. watervrij cobaltsulfaat in 100 cc gedestilleerd water); de kleur hiervan is evenwel meer geelrood dan die van het ferrirhodanaat.

H u n t e r meent, dat een oplossing van cobaltsulfaat van 1,9 gr. op 100 water beter de Eenheid benadert dan de opgave van H i j m a n s v a n d e n B e r g h.

In een andere opgave is de sterkte, die H i j m a n s v a n d e n B e r g h gebruikt 2,16 gr. cobaltsulfaat in 100 cc water; G o d f r i e d ⁶⁸⁾ vindt, dat de laatste standaardoplossing beter is dan die volgens H u n t e r, wat betreft de grootte der eenheid.

Met zijn methode kon Hijmans van den Bergh in het bloed van de meeste normale mensen bilirubine in meetbare hoeveelheid aantoonen. De waarden die hij vond, liggen tusschen $\pm 0,3$ en $0,5 \text{ E} = \pm 0,15 - 0,25 \text{ mgr. \% bilirubine}$. Het bleek hem echter, dat, indien men sera onderzocht afkomstig van patiënten lijdende aan stuwingsicterus, een deel van het bilirubine zich aan de bepaling onttrok, doordat het zich aan het eiwit-neerslag hechtte.

Bij sera afkomstig van patiënten met dynamischen icterus, en bij paardenserum zou dit niet of zeer weinig het geval zijn. Verder was de vergelijking der kleur met die van den standaard soms moeilijk, daar de tinten niet gelijk waren.

Van de methode, zooals deze oorspronkelijk werd meegedeeld, moet dus gezegd worden, dat zij naast betrekkelijk gemakkelijke uitvoerbaarheid eenige groote bezwaren vertoonde, die de meting dan ook tot een schatting maakte. Deze bezwaren waren:

- a. het verlies door adsorptie van het bilirubine aan de eiwitten, die het sterkste is bij sera, die de directe reactie geven, doch zooals we zagen (bladz. 52) ook voorkomt bij normale en pathologische sera, die de vertraagde reactie vertoonen;
- b. de vrij sterke verdunning (4 malen), die het serum ondergaat alvorens het tot eindvloeistof geworden is, waardoor sera met een normaal of te laag gehalte aan bilirubine (b.v. chronische nephritis) niet meer nauwkeurig te onderzoeken zijn;
- c. slechte vergelijkbaarheid van de tint van het gediazoteerde alcoholische filtraat met die van den standaard.

Het verlies door adsorptie was voor Hijmans van den Bergh reden om eenige aanwijzingen te geven hoe dit verminderd zou kunnen worden. Deze komen later ter sprake (bladz. 108).

Thannhauser en Andersen¹⁹⁵) stelden een methodiek op, welke het bezwaar der adsorptie aan de eiwitten voor een deel ondervindt. Bij direct reageerende sera voegden zij eerst diazoreagens toe; als de koppeling maximaal was, onteiwitten zij

het mengsel met alcohol en ammoniumsulfaat. Zij hadden bemerkt, dat azobilirubine zich minder aan de proteïnen hechtte dan bilirubine zelf en verder dat alcohol een goed oplosmiddel voor azobilirubine was. Zij gingen als volgt te werk:

Bij 2 cc serum voegden zij 1 cc diazoreagens en wachtten tot de maximale kleur was opgetreden; dan voegden zij 5,8 cc 96 % alcohol toe en 2 cc verzadigd ammoniumsulfaatoplossing. Na centrifugeeren werd bij 0,9 cc bovenstaande vloeistof 0,1 cc geconcentreerd zoutzuur gevoegd (de reden hiervan komt aanstonds ter sprake). Zij geven op 6 malen te verdunnen, wat bij directe sera met weinig bilirubine een nadeel is. Echter blijkt bij de bepaling het ammoniumsulfaat niet met de andere vloeistoffen te zijn gemengd en zich kleurloos onder in de centrifugebuis te bevinden. Zoodoende is de verdunning bij deze door hen opgegeven verhoudingen ongeveer 5. Door het kiezen van andere hoeveelheden kan men de verdunning tot 4 terug brengen, welke dan dezelfde is als bij de reactie volgens H i j m a n s v a n d e n B e r g h. Het blijkt uit de uitkomsten van vergelijkende bepalingen, dat de opbrengsten volgens de methode van T h a n n h a u s e r e n A n d e r s e n aanmerkelijk hooger zijn dan die volgens H i j m a n s v a n d e n B e r g h. De adsorptie der bilirubine aan het eiwitpraecipitaat kan niet meer plaats vinden, het azobilirubine hecht er zich slechts in geringe mate aan.

Daar zij ook last hadden van vrij slechte kleurvergelijkbaarheid, stelden zij voor om gebruik te maken van het feit, dat azobilirubine een indicator is. In sterk zure omgeving is deze kleurstof donkerblauw, in neutraal en zwak zuur milieu rose tot violet en in alcalisch milieu blauwgroen. Ten einde onafhankelijk te zijn van tintverandering door wisseling van de pH, stelden zij voor het milieu sterk zuur te maken en dan de zuiver blauwe kleur te vergelijken met die, uit een zuur gediazoteerde bilirubine-oplossing verkregen. Het bezwaar hiertegen was weer, dat de bilirubinestandaard, die zij hiervoor gebruiken en die vaak vernieuwd moet worden, kostbaar in het gebruik is. Het meten ten opzichte van het zure azobilirubine is in het algemeen dan ook weer verlaten, doch de verbetering der methode, wat betreft de adsorptie aan de eiwitten, is aanleiding geweest dat

de methode, zooals Hijmans van den Bergh die beschreef, veelal is vervangen door die van Thannhauser en Andersen. Wel schrijft Koopman¹²⁰⁾ in zijn boekje **Laboratoriummethoden voor den practischen arts**: „Natuurlijk is ook deze (de methode van Hijmans van den Bergh) door sommige onderzoekers afgebroken, maar bijna allen die ernstig een aantal methoden vergeleken hebben, zullen deze methode als „de methode bij uitstek“ beschouwen“, doch zeer veel anderen konden bij vergelijking der beide methoden niet anders doen dan aan die van Thannhauser en Andersen de voorkeur geven, daar deze een fout der oorspronkelijke methode voor een deel ondervindt en zoo de hoogste opbrengsten gaf. We noemen slechts: Thannhauser en Andersen¹⁹⁵⁾, Weltmann en Jost²⁰⁴⁾, welke de methode volgens Hijmans van den Bergh onbruikbaar achten, Piotrowski¹⁵⁸⁾ Mc Nee en Keefer¹⁵²⁾, Shay en Schloss¹⁸⁰⁾, Hunter⁹⁴⁾, White²⁰⁶⁾, Dominici en Marengo⁴²⁾, Bensley²³⁾, Barrow¹⁵⁾, Fiessinger en Walter^{57.58)}, Jourdain¹⁰⁹⁾, Muller¹⁴⁸⁾ en tenslotte ook Hijmans van den Bergh^{99.103)} zelf.

Wij werden ook voortdurend getroffen door het groote verschil tusschen de uitkomsten der beide methoden, bijv.:

Hijmans van den Bergh	Thannhauser en Andersen	Ziekte
4 E	7,2 E	genezende icterus cath.
6,8	9,75	cholelithiasis
10,3	13,45	beginnende ict. cath.
2,4	5,—	cholecystitis
2,6	6,36	carc. pap. Vateri

Thannhauser en Andersen¹⁹⁵⁾ raden hun methodiek slechts aan voor sera met de directe reactie. Bij vertraagd reagerende sera gebruiken zij de oorspronkelijke methode, daar in dit geval de adsorptie van bilirubine aan het neergeslagen

eiwit gering is. Men kan bij vertraagd reageerend serum echter evengoed hun methode gebruiken, zooals volgende tabel leert:

Herkomst van bloed	Hijmans van den Bergh	Thannhauser en Andersen
apoplexia cerebri	4,4 E	4,65 E
anaemia pern.	6,69	7,8
anaemia pern.	7,5	6,9
anaemia pern.	5,2	5,5
diabète bronzé (zwak direct)	7,3	8,8
apoplexia cerebri, myodegen. cordis paard	3,2	4,5 direct pos?
paard	4,5	3,75
paard	3,5	3,9
paard	3,2	3,9
paard	1,5	1,3
icterus haemolyticus	6,—	6,3
pleurapunctaat	0,8	1,—

Zooals men ziet is de reactie volgens Thannhauser en Andersen in het algemeen niet het laagst in opbrengst. De restrictie die deze onderzoekers voor hun methode maakten, lijkt dan ook overbodig en men kan ermede volstaan, hun werkwijze voor alle sera te gebruiken, wat ook daarom van nut is, omdat men nooit zeker weet, of een serum alleen direct reageerend bilirubine bevat, of een mengsel van direct en vertraagd.

Een bezwaar tegen de werkwijze van Thannhauser en Andersen is, dat de roode eindvloeistof na eenig staan dikwijls troebel wordt; centrifugeeren heft dit op. Verder wordt de eindvloeistof na verdunnen met 50 % alcohol, zooals men dit vrij algemeen doet, dikwijls troebel. Verdunning met water in plaats van alcohol voorkomt deze troebeling, die aan ammonium-sulfaat te wijten is; de zoo verdunde vloeistof blijft eenige dagen helder.

Deze methode is dus alleszins een groote vooruitgang op de door Hijmans van den Bergh aangegeven werkwijze, maar ook bij haar wordt nog een deel van de gevormde azo-bilirubine door de eiwitadsorptie aan de bepaling onttrokken.

Weltmann en Jost²⁰⁴⁾ verbeterden de vorige methode door alcohol en reagens gelijktijdig aan het te onderzoeken serum toe te voegen. Zij vergelijken ook de kleuren in sterk zuur milieu. Verder is hun reactie geschikt om zoowel direct als vertraagd reageerend serum te onderzoeken. Zij gaan als volgt te werk: $\frac{1}{2}$ cc reagens (bij zwakke sera 0,3 cc) wordt bij 3,9 cc (respectievelijk 4,1 cc) 96 % alcohol gevoegd. Hierbij wordt 1 cc serum gedaan, geschud en 5 minuten gewacht tot de maximale koppeling bereikt is. Nu voegen zij een weinig ammoniumsulfaatpoeder toe, schudden 2 minuten en filtreren. Bij 0,9 cc filtraat voegen zij 0,1 cc geconcentreerd zoutzuur. De verdunning bedraagt 1 op 6. Als vergelijkingsvloeistof gebruiken zij zuur gediazoteerde bilirubine-oplossing. Volgens de schrijvers zouden hun opbrengsten hooger zijn dan volgens de methode van Thannhauser en Andersen. Hartog bewees, dat de modificatie van Weltmann en Jost niet alle bilirubine in een serum aanwezig aantoonde.

De sterke verdunning (1 : 6) maakt de methode ongeschikt om lage bilirubinewaarden in sera te meten. De methode lijkt dan ook geen bijzondere voordeelen te bieden boven de wijze van werken van Thannhauser en Andersen.

Dominici en Marengo vonden dat de methode van Weltmann en Jost hogere waarden geeft dan de bepaling volgens Thannhauser en Andersen.

Laemmer en Beck¹²⁵⁾ bepalen de totale hoeveelheid bilirubine als volgt: zij brengen 0,5 cc serum en 0,25 cc reagens samen, zij wachten 2 minuten, voegen dan 0,25 cc verzadigd ammoniumsulfaat toe, schudden en centrifugeeren. Met zoutzuur krijgen zij voor de colorimeterbepaling een blauwe eindvloeistof. Het is niet duidelijk hoe zij in twee minuten het vertraagd reagerende bilirubine, dat in vele sera naast het direct reagerende aanwezig is, tot reactie brengen. Bij zuiver directe sera kan een dergelijke methode bruikbaar zijn, echter heeft het door ammoniumsulfaat verkregen eiwitneerslag, wanneer geen alcohol tegelijk aanwezig is, sterk de neiging azobilirubine mee te slepen.

De roodvioletten eindkleur der diazoreactie in serum gaf, tenzij

men als standaard zuiver bilirubine gebruikt, moeilijkheden bij de vergelijking met de standaardvloeistoffen van H ij m a n s v a n d e n B e r g h, weshalve naar betere gezocht werd.

H a s e l h o r s t ⁸¹⁻⁸²⁾ gebruikte als zoodanig een alcoholische oplossing van Bordeauxrood met methyleenblauw; G r e p p i e n d e M i c h e l i v o n d e n d i t e e n v e r b e t e r i n g, P i o t r o w s k i e c h t e r e n o o k H o l z e r e n M e h n e r ⁹¹⁾ waren minder tevreden over deze verandering.

M c N e e beval een oplossing van kaliumpermanganaat aan, maar de sterkte van de verdunde oplossing dezer stof loopt sterk terug.

A. A d l e r e n M e y e r ⁷⁾ stelden een geijkte, colorimeter samen, waarbij men geen vergelijkingsvloeistof nodig heeft; voor bijzonderheden zie men de oorspronkelijke publicatie.

N i c h o l s e n W a r r e n J a c k s o n ¹⁵⁴⁾ gebruikten een zoutzure oplossing van cobaltsulfaat, waarmee zij beter vergelijkbare kleuren kregen. H a r t o g bevestigt dit; ook W h i t e bereikte hiermee goede resultaten.

N e w m a n ¹⁵³⁾ vergeleek het azobilirubine in zuur milieu met een oplossing van aniline-gentiaanviolet in alcohol, doch is over de kleurgelijkheid niet geheel tevreden.

C h i r a y e n T h i e b a u t ³⁶⁾ vonden een methode om den bilirubinestandaard langen tijd goed te houden.

H u n t e r verkreeg een beter vergelijkbare kleur tegenover cobaltsulfaat, door aan het serum een mengsel van diazoreagens en fosphaatbuffer toe te voegen ($6\% \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 12 H_2O in water). Hij vergelijkt tegen een cobaltstandaard, welke 1,9 gr. anhydrisch cobaltsulfaat bevat per 100 cc.

A D B. Methoden, waarbij de vorming van een neerslag der eiwitten wordt vermeden.

Verschillende onderzoekers hebben getracht het bezwaar te ondervangen van de adsorptie van bilirubine, respectievelijk azobilirubine aan een eiwitneerslag. Het toevoegen van alcohol of aceton heeft, behalve dat hiermee het serumeiwit gepraecipiteerd wordt, tevens de bedoeling om vertraagd reagerend bilirubine in reactie te doen treden met het diazoreagens. Nu zou

een stof, die ook de vertraagde reactie versnelt en daarbij de serumeiwitten in oplossing houdt, voordeelen bieden boven alcohol.

Enriques en Sivo⁴⁹⁾ vonden deze stof in benzoas natricus c. coffeino, die de vertraagde reactie zooveel versnelt, dat zij in snelheid die van het directe bilirubine evenaart (Adler en Strausz, zie pag. 3). Zij voegen bij 0,5 cc serum 0,5 cc 20 % benzoas natricus c. coffeino-oplossing en 0,2 cc diazoreagens. Er ontstaat nu een roode vloeistof, waarvan zij colorimetrisch de sterkte bepalen; hun verdunning (5 op 12) is gering; er is geen verlies aan galkleurstof door adsorptie aan eiwit, maar de ontstane kleur is slecht met den cobaltstandaard te vergelijken.

Tegenover een bilirubineoplossing zou de methode zeer scherp kunnen zijn. Bij de meeste personen verschilt volgens hen de bilirubinespiegel van het bloed tusschen 0,65 en 1,10 m.gr. %, dat is eenige malen hoger dan tot nu toe gevonden werd.

Hartog acht, dat dit verschil veroorzaakt wordt, doordat de vloeistof van Enriques en Sivo zoo moeilijk vergelijkbaar is met den cobaltstandaard. Deels kan dit juist zijn, echter moet niet uit het oog verloren worden, dat ook bij vertraagd reagerende sera een deel der bilirubine aan het eiwitpraecipitaat blijft hechten, zooals wij op bladz. 52 aantoonen. Ook Sivo en Enriques stelden dit vast, door het neerslag met diazoreagens en benzoas natricus c. coffeino te schudden.

Jendrassik en Czike¹⁰⁵⁾ voerden een dergelijke reactie in. Bij 2 cc serum en 0,5 cc 50 % benzoas natricus c. coffeino voegden zij 1 cc reagens, hetwelk iets minder nitriet bevatte dan normaal (10 cc Ehrlich A en 0,1 cc Ehrlich B). Na 10 minuten werden door 6,7 cc alcohol 96 % de eiwitten gepraecipiteerd. Na filtratie werd de kleur beoordeeld, eventueel via verdunnen met alcohol 60 %. Zij verwerpen dus het voordeel dat Enriques en Sivo bereikten door geen eiwitneerslag te verwekken. Verder is de verdunning 1 : 5, dus vrij sterk. Zij zeggen dezelfde waarden bij normale sera te vinden als Hijmans van den Bergh. Bij directe sera zou met hun methode 2—30 % meer opbrengst zijn dan met de reactie van Thannhauser en Andersen.

Domenici en Marengo vonden deze methode echter minder goed dan die van Thannhauser en Andersen.

Greppi en de Micheli¹⁴⁴⁾ maken sera zoo zuur, dat met alcohol geen neerslag meer optreedt. Het bezwaar hiertegen is de blauwviolette kleur van de ontstane lijmachtige vloeistof.

Een methode, welke geen eiwitneerslag vormt, is die van Chabrol, Charonnat en Busson³⁴⁻³⁵⁾. Hun „diazoreaction limite” wordt als volgt uitgevoerd: het serum wordt in een reeks buisjes verdund met 15 % oplossing van magnesiumsulfaat en hierop wordt voorzichtig het reagens gebracht. Het magnesiumsulfaat maakt de onderlaag zwaar, zoodat er niet gemakkelijk menging met het reagens optreedt. Na 15 minuten wordt nagegaan in welke buis nog een roode ring te zien is. Dit grensbuisje bevat 2 mg. % bilirubine, zooals met behulp van een bilirubine-oplossing in eiwit werd bepaald. Uit de verdunning, die bij dit grensbuisje is gemaakt, valt te berekenen hoeveel bilirubine er in het serum aanwezig was.

Chabrol breekt hiermede met het toevoegen van stoffen als alcohol, aceton of benzoas natricus c. coffeino, die de reactie van vertraagd reageerend bilirubine moeten versnellen. Hij hecht dan ook niet aan het verschil tusschen direct en vertraagd reageerend serum, doch het lange wachten (15 minuten) voor de aflezing is al een tegemoetkoming aan de vertraagde reactie.

Chabrol meent, dat het optreden van een gekleurden ring beter te beoordeelen is dan de vergelijking van twee niet precies gelijke tinten.

De methode werd door Fiessinger en Walter afgewezen, daar ze geen voordeelen van belang zou bieden, moeilijk was en lang duurde.

Hartog paste de reactie toe en was over de uitkomsten tevreden. We moeten hierbij nog in herinnering brengen, dat Lepohne de ringreactie toepaste, doch deze weer verliet als niet doeltreffend.

Bakaltschuch¹⁴⁾ heeft een dergelijke „diazoreaction limite” ontworpen als Chabrol; 0,16 m.gr. % bilirubine is met zijn methode te herkennen. Hensberg⁸⁶⁾ is over deze

werkwijze tevreden. Zij lijkt ons, evenals de methode van Chabrol, erg tijdrovend.

Hunter, gebruik makende van de waarnemingen van Davies en Dodds, dat vertraagd bilirubine in een fosfaatbuffer opgelost met diazoreagens direct reageert, voegde aan het serum een mengsel van reagens en fosfaatbuffer toe; zonder de eiwitten neer te slaan, vergeleek hij de zoo ontstane kleur met een cobaltstandaard.

Hijmans van den Bergh ondervindt het verlies aan het eiwitpraecipitaat bij directe sera voor een deel door deze, bij hoog gehalte aan galkleurstof, van te voren te verdunnen. Het eiwitneerslag, na toevoegen van alcohol, was nu veel kleiner en sleepte minder bilirubine mee (zooals een tabel in zijn monographie demonstreert).

In 1934 onderwierp Hijmans van den Bergh¹⁰³) gezamenlijk met Grotépass¹⁰⁴) de methode der galkleurstofbepaling in het bloedserum opnieuw aan een critische beschouwing. Het resultaat hiervan waren eenige groote verbeteringen in de methodiek, welke culmineerden in een nieuwe methode van quantitative bepaling (de reactie van Hijmans van den Bergh en Grotépass¹⁰³⁻¹⁰⁴) (H en G).

Zij bevelen aan de colorimetrie in monochromatisch licht te verrichten. Wanneer van de verschillende geazoteerde bilirubineoplossingen (direct, vertraagd en kunstmatige) met behulp van een bufferoplossing bij dezelfde pH absorptiecurven gemaakt werden, bleken deze ongeveer hetzelfde verloop te hebben en in het gebied der maximale extinctie ($520-546 \mu$) samen te vallen. Met behulp van een groen filter, dat slechts de stralen tusschen deze golflengten doorlaat (Zeissfilter S 53), kan men de kleuren van geazoteerde sera met een standaardoplossing van bilirubine vergelijken. Evengoed als door een standaardvloeistof, kan men het licht op constante wijze door een vast tralierooster laten verzwakken. Met de op die manier verkregen constante intensiteit van groen kan men de azobilirubine vergelijken.

Wanneer men van een dergelijken photometer met kunstmatige bilirubineoplossingen van bekende sterkte een ijkingscurve maakt, kan men via deze curve direct den afgelezen stand

van den photometer in de sterkte der te onderzoeken vloeistof uitdrukken.

Het vermijden van een eiwitneerslag is een tweede verbetering, die zij bereikten door 50 % alcohol te gebruiken; bij een zekere verhouding van alcohol, serum en reagens ontstond nu geen troebeling. Daar de photometrie in monochromatisch licht bij een bepaalde pH moet worden verricht, werd ook een buffer-oplossing toegevoegd (buffer van Mc. Ilvaine pH 6,6, bestaande uit 27,25 cc 0,1 mol. citroenzuur en 72,75 cc 0,2 mol. secundair natriumphosfaat).

De uitvoering wordt nu als volgt: Men mengt 1 cc serum en 2 cc reagens, laat 5 minuten in het donker staan, vult met aq. dest. aan tot 5 cc en met bufferalcohol (90 deelen alcohol 50 % en 10 deelen Mc. Ilvaine buffer) tot 10 cc. Na 15 minuten is de koppeling volledig en kan de photometrische bepaling verricht worden. De verdunning bedraagt 1 : 10.

De beschreven modificatie is alleen te gebruiken voor direct reageerende sera, welke een vrij hoog bilirubinegehalte hebben⁸³⁾, daar de verdunning zoo groot is. Vertraagde sera worden nog volgens de oorspronkelijke methodiek bewerkt¹⁰³⁾.

De azo-bilirubine-oplossing, waarmede de photometer geijkt wordt, wordt als volgt samengesteld: 5 mg bilirubine oplossen in 100 cc chloroform, 10 cc dezer oplossing in een waterbad onder koolzuur tot bijna droog indampen. Aan het residu wordt ongeveer 80 cc toegevoegd van een vloeistof, die bestaat uit 90 cc alcohol 50 % en 10 cc van den buffer van pH 6,6. De bufferalcohol wordt eenigen tijd verwarmd om de chloroform weg te dampen. Daarna wordt de vloeistof op kamertemperatuur gebracht en 20 cc reagens toegevoegd, waarna de vloeistof met bufferhouden alcohol op 100 cc wordt gebracht. Om de koppeling volledig te doen zijn, laat men de oplossing 15 minuten in het donker staan.

Deze azobilirubine-oplossing vertoont werkelijk een verdunning van 1 : 200.000, wat schijnbaar gelijk is aan den standaard van één eenheid. Echter hadden Hunter en Rabinowitch opgemerkt, dat de vroeger door Hijmans van den Bergh aangegeven eenheid een verdunning van 1 : 250.000 beteekent

(zie bladz. 99). Bij deze nieuwe bilirubine-oplossing wordt de eenheid op een sterkte 1 : 200.000 gehouden, d.w.z. schijnbaar gelijk aan de vroegere eenheid, doch zoo, dat dus in werkelijkheid deze eenheid een andere is dan die vroeger werd ingevoerd¹⁰³). Dit zal verwarring kunnen geven en vergelijking van de waarden met deze nieuwe methode met die der oude colorimetrische zal reeds hierdoor alleen, onafhankelijk van de methodiek, verschillen aanwijzen.

Het toevoegen van den buffer pH 6.6 wekt den indruk, dat de te onderzoeken vloeistoffen op dezen zuurgraad gebracht worden. Groot was dan ook onze verbazing, dat de pH der standaardbilirubine-oplossing na diazoteeren 2.45 bedroeg. Indien in plaats van bufferalcohol gewone 50 % alcohol werd gebruikt, bleek de standaard pH 1.85 te hebben. Bij de vloeistof, zooals H en G deze verkrijgen bij de bepaling in direct serum, was de pH 2.86; met 50 % alcohol, zonder buffer, was de pH 2.16. Indien de indirecte reactie op de oude wijze van *Hijmans van den Bergh* gedaan werd, was de pH 2.55. Waarom een buffer van pH 6.6 werd toegevoegd, om vloeistoffen op een pH 2.86, resp. 2.45 te brengen, is niet duidelijk. Het betrekkelijk hoge zuurgehalte van de 20 cc diazoreagens (= ± 20 cc 1%₁₀ N HCl) is te hoog voor de capaciteit van den buffer.

Wat kan het nut van de toevoeging van 50 % alcohol zijn?

1°. Verdunningsvloeistof, maar hiervoor zou ook een zoutoplossing gebruikt kunnen worden. Water is minder geschikt, omdat het een troebeling geeft.

2°. De alcohol (welks eindconcentratie bij directe sera 22,5 %, bij vertraagde sera 59 % en bij de ijkingsvloeistof 36 % bedraagt) zou dienen om het vertraagde bilirubine prompt te doen reageren. Nu is de reactie van H en G alleen geschikt, volgens *Hartog*⁸³) (bladz. 39), voor direct reagerende sera. Voor een mengsel van direct en vertraagd, zooals vele sera zijn, zou de reactie dus minder in aanmerking komen.

Een percentage van 22,5 % alcohol is te gering om vertraagd bilirubine snel te doen reageren, maar na eenig wachten zet zich de kleurstof in dit milieu toch wel om tot azobilirubine. Het is dan ook niet goed in te zien, waarom vertraagd reagerend

serum volgens deze methode niet quantitatief bepaald zou worden. De tijd van 15 minuten, die volgens H en G voor de diazoteering beschikbaar is, is ook voor het vertraagd bilirubine in deze omstandigheden voldoende. Daar H en G voor direct en vertraagd bilirubine een verschillende methode bezigen, vragen wij ons af welke methode volgens hen gebruikt moet worden, indien een te onderzoeken serum een mengsel bevat van de twee bilirubine modificaties. Wij vonden dat paardenserum (vertraagd) volgens de methode van H ij m a n s v a n d e n B e r g h e n G r o t e p a s s een zeer goed gekleurde eindvloeistof gaf.

Misschien kan men de methode van H ij m a n s v a n d e n B e r g e n G r o t e p a s s verbeteren door te zorgen voor een constante pH van bijv. 6,—, onverschillig of men de methode uitvoert met direct of wel vertraagd reageerend, of wel een mengsel van die twee bilirubines.

Behalve door de zooeven besproken methode kan men naar onze meening trachten het totale bilirubine van het serum als volgt te bepalen:

- a. sterke vermeerdering van het aantal moleculen diazoniumverbinding. Immers in hoofdstuk II en III zagen we dat dit ook vertraagd bilirubine snel doet reageeren, bijv. met reagens $3/1000 + 15/1000 + 0,7$.

De ontstane kleur is in den colorimeter te vergelijken.

- b. toevoegen van rhodaankalium in groote hoeveelheid. Immers in hoofdstuk IV en VI zagen we dat een dergelijke toevoeging ook vertraagd bilirubine snel doet reageeren.

Op de volgende wijze kan men tot zijn doel komen. Aan 1 cc serum wordt 1 cc normaal KCNS oplossing toegevoegd en vervolgens 0,2 cc reagens. Na eenige minuten kan men aflezen. Beter doet men als volgt: In 1 cc serum lost men een mespunt KCNS op, vervolgens voegt men voorzichtig 0,1 cc reagens toe; een troebeling verdwijnt door omschudden. De verdunning is nu $11/10$, in korten tijd is de omzetting compleet en na verdunning kan men colorimetreeren. (Haemolyse van het serum is natuurlijk een beletsel; met de later te beschrijven talkmethoden is ook deze geen bezwaar meer.)

Om snel een overzicht te hebben van de eventueele aanwezigheid van directe reactie en van de totale hoeveelheid bilirubine, kan men als volgt te werk gaan: In twee Widalbuisjes brengt men een cc serum, voegt bij het ééne $\frac{1}{4}$ cc 0.9 % keukenzoutoplossing en schudt door. In de andere buis brengt men $\frac{1}{4}$ cc diazoreagens en noteert, met het serum-zoutmengsel als contrôle, of een directe reactie (verkleuring binnen 40 seconden) te zien is. Is er geen of een zwakke directe reactie, dan voegt men eenige kristallen KCNS toe; na een paar minuten is ook het vertraagde bilirubine omgezet in azobilirubine. De nu ontstane roode vloeistof wordt zoo noodig verdund en in den colorimeter tegen de cobaltstandaard bekeken. Een nauwkeurige vergelijking is niet mogelijk, doch in lamplicht bekeken, kan men wel ongeveer den colorimeter instellen en hieruit een schatting maken omtrent de hoeveelheid bilirubine. Tegenover het bezwaar der geringe nauwkeurigheid, veroorzaakt door het niet gelijk in tint zijn van de twee vloeistoffen, staat het voordeel, dat men in enkele minuten een schatting kan maken, geen instrument als een centrifuge noodig heeft en het gebruik van door de accijns zeer duren alcohol voorkomt. Bij sera, die vrij veel direct bilirubine bevatten, is de uitkomst zeker beter dan volgens de reactie van Hijmans van den Bergh, daar er geen neerslag wordt gevormd, dat direct reageerend bilirubine adsorbeert. Voor de algemeene practijk lijkt mij deze methode dan ook bruikbaar.

Tenslotte laten we hier een aantal getallen volgen, welke volgens de onderzoekers de normale bilirubinewaarden in het menschelijk bloedserum zijn:

Naam		Bilirubinewaarde
Hijmans van den Bergh ¹⁰²⁾		0,1 —0,3 m.gr. %
Förster ⁶³⁾		0,2 —1 „
Sivo ¹⁸¹⁾		0,65—1,2 „
Botzian ²⁸⁾		0,75 „
Hazelhorst ⁸¹⁻⁸²⁾	mannen	0,21—0,5 „
	vrouwen	0,12—0,35 „
Mandelbaum ¹³⁸⁾		0,62 „
Hetenyi ⁸⁹⁾		2 „
Peter ¹⁵⁷⁾		0,5 „
Muller en Engel ¹⁴⁸⁾		0,6 —2 „
Rozendaal en Comfort ¹⁷⁵⁾		1,5 „
Herzfeld ⁸⁷⁾		6 „
Chabrol ³⁴⁻³⁵⁾		3 „
Kerppola ¹¹⁹⁾	mannen	0,24—0,82 „
	vrouwen	0,3 —0,84 „
Bakaltschuch ¹⁴⁾		0,16—0,62 „

Bij alle tot nu toe beschreven methoden werd het totale bilirubine in een serum bepaald, zonder dat onderscheid gemaakt werd tusschen direct en vertraagd reageerend bilirubine. Tusschen de twee uitersten, waarbij alles òf in den vorm van direct reageerend bilirubine òf van vertraagd reageerend bilirubine aanwezig is, zijn vele overgangen, zooals tot uiting komt in de biphasische reactie van Feigl en Querner en in de verschillende typen die Lepehne (zie bladz. 4) voor de diazo-reactie opstelde. Het biphasisch verloop hiervan heeft Hartog graphisch vastgelegd. Of nu in een bloedserum twee verschijningswijzen van bilirubine gelijktijdig voorkomen, kan klinisch van belang zijn en speciaal hoeveel van elk aanwezig is. Voor zoover wij na konden gaan, was Grunenber g de eerste, die een poging deed beide stoffen apart quantitatief te bepalen. Hij maakte gebruik van de door hem ontdekte eigenschap, dat vertraagd reageerend bilirubine extraheerbaar is met chloroform, direct reageerend daarentegen eerst na aanzuren van het serum. In de beide fracties bepaalde hij spectrophotometrisch het

bilirubinegehalte. Behalve het feit, dat de extractie met chloroform niet zoo eenvoudig en volledig is als hij meedeelt (Andrewes), is ook de dure apparatuur een bezwaar.

Hannema⁷⁷⁾ zette een beginsel uiteen (hetwelk hij hier zelf beschrijft) om direct en vertraagd bilirubine in een serum quantitatief te scheiden. Zijn methode zou echter volgens hem zelf slechts in bepaalde gevallen te gebruiken zijn. Hij ging er van uit, dat, wanneer een serum alléén retentie-bilirubine bevat, en slechts zoo weinig dynamisch, dat men dit negeeren kan (normaal), de directe diazoreactie een roode kleur geeft, die met de door Hijmans van den Bergh aangegeven contrôlevloeistof vergeleken kan worden. Bevat het serum, behalve retentie-, ook dynamische bilirubine in eenigszins belangrijke hoeveelheid, dan geeft deze, die onvoldoende of niet omgezet wordt, een geelbruine bijkleur, die de vergelijking onmogelijk maakt. Hoe grooter de verhouding retentie- tot dynamische bilirubine is, des te grooter is de kans, dat de kleur bij de directe reactie rood genoeg is om vergeleken te worden.

Hij heeft zich nu afgevraagd of het mogelijk is, om, nadat men langs de indirecte methode het bilirubinegehalte van een serum quantitatief bepaald heeft, uit het al of niet vergelijkbaar zijn van de kleur, die men met de directe methode krijgt, een indruk te verkrijgen of het serum, behalve retentie-bilirubine, ook een verhooging van dynamisch bilirubine heeft, welke laatste normaal slechts $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ eenheid bedraagt. Wanneer hij serum van een retentie-icterus, zonder dat er een reden was aan te nemen, dat de dynamische bilirubine verhoogd was, met zoutoplossing verdunde, kon Hannema deze verdunning zeer ver doorvoeren en toch bij de directe reactie een vergelijkbare kleur krijgen. Werd inplaats van zoutoplossing ter verdunning normaal serum genomen, dus $\frac{1}{2}$ à $\frac{3}{4}$ eenheid dynamisch bilirubine bevattende, dan zag hij, dat het oorspronkelijke retentie-serum slechts tot 1 : 50.000 en 1 op 60.000 (dus 3 à 4 eenheden) verdund kon worden, om nog een vergelijkbare kleur te krijgen. Ging de verdunning door middel van het normale serum nog verder, dan werd de invloed van de niet omgezette dynamische bilirubine van het normale verdunningsserum zoo groot, dat bij de directe

reactie geen vergelijkbare kleur meer werd verkregen.

Werd de verdunning gedaan met het serum van een anaemia perniciosa, dat ± 2 eenheden dynamisch bilirubine bevatte, dan kon de verdunning van het retentie-serum niet verder gaan dan 1 : 20.000 (± 10 eenheden); sterker verdunning leverde een serum, waarbij de roode verkleuring der directe reactie te veel door de dynamische bilirubine gehinderd werd, om met de contrôlevloeistof vergeleken te kunnen worden.

De verdunning werd bij deze derde proef niet gedaan met een serum, dat nog meer dynamisch bilirubine bevatte dan 2 eenheden (bijv. van een haemolytische icterus), daar dergelijke groote verhoogingen van dynamisch bilirubine slechts bij verhoogde haemolyse voorkomen en niet tengevolge van leverinsufficiëntie alleen; het is er om te doen dit laatste op te sporen. Op grond van deze proeven verdeelt H a n n e m a de icterus-sera met positieve directe reactie in zes groepen:

Groep 1.

Volgens indirecte reactie gevonden 1 : 20.000 (10 eenheden) of sterker, de directe reactie niet vergelijkbaar.

Groep 2.

Volgens indirecte reactie 1 : 20.000 (10 eenheden) of sterker, de directe reactie wel vergelijkbaar.

Groep 3.

Quantitatief 10 tot 3 eenheden en directe reactie niet vergelijkbaar.

Groep 4.

Quantitatief 10 tot 3 eenheden en directe reactie wel vergelijkbaar.

Groep 5.

Quantitatief 3 eenheden of minder, de directe reactie niet vergelijkbaar.

Groep 6.

Quantitatief 3 eenheden of minder, directe reactie wel vergelijkbaar.

Dynamische bilirubine verhoogd (dit meest bij ziekten met verhoogde haemolyse, waarbij om de een of andere reden ook retentie-icterus opgetreden is).

Over dynamische bilirubineverhoging niet te oordeelen, meestal bij ziekten met zoo sterke retentie practisch klinisch ook niet van veel belang.

Dynamische bilirubine verhoogd.

Dynamische bilirubine niet of weinig verhoogd.

Over dynamische bilirubine niet te oordeelen.

Dynamische bilirubine niet verhoogd.

Hannema schrijft er bij, dat het te betreuren is, dat de veelvoorkomende 5e groep in het onzekere laat. Soms kan de duidelijk tweephasische reactie toch nog doen besluiten, dat de dynamische bilirubine verhoogd is.

Wij hadden geen gelegenheid de ingenieus bedachte methode te probeeren.

Kerppola en Leikola ^{112, 113)} deelden mee, dat het hun gelukt was de twee fracties apart quantitatief te bepalen. Ook zij extraheeren met chloroform en bepalen de bilirubine-quanta der fracties of met de diazomethode, of door de gele kleur der chloroformextracten te vergelijken met een standaardvloei-stof. De methode lijkt zeer ingewikkeld.

de Castro ³¹⁾ ging als volgt te werk. Hij schudde 1 cc serum met 2 cc chloroform, waarna hij centrifugeerde, om de lagen te scheiden. 1 cc chloroform werd ingedampt en bij de rest 0,1 cc chloroform + 0,9 cc alcohol -- 0,25 cc diazo gevoegd. De verdunningsfactor was zoo 2,5. Hij bepaalt aldus de fractie van het in chloroform oplosbare (vertraagde?) bilirubine. De directe fractie bepaalde hij met een oxydatiemethode, door hem ontworpen, waarbij hij gebruik maakte van Sabatini's reagens. Hij deelde mee, dat steeds serum een mengsel van de twee modificaties is.

Veel is door Varela ¹⁹⁶⁻¹⁹⁷⁾ en medewerkers gedaan om de twee fracties van elkander te scheiden. Zij verbeterden de methode van de Castro door niet eenmaal maar meermalen met chloroform te extraheeren. In deze extracten, die zij tezamen voegden, bepaalden zij het vertraagde bilirubine. Het directe gedeelte, dat in het serum was achtergebleven, werd ook met de diazo-methode gemeten. Daartoe werd 1 cc serum met 2 cc 12% natriumsulfaatoplossing gemengd en dit mengsel met 5 cc chloroform uitgeschud en gecentrifugeerd. Nadat de chloroform afgepipetteerd is, wordt het serum nog ééns of meermalen met chloroform uitgetrokken, zoolang, tot deze kleurloos blijft. De verschillende porties chloroform worden samengevoegd en op een waterbad bij 80° verdampt. Het residu wordt opgelost in 0,2 cc chloroform, 1,7 cc alcohol 96% en 0,1 cc reagens. Na 10 minuten kan men colorimetreeren. De verdunning is 1 op 2. Het

directe bilirubine wordt bepaald door bij het geextraheerde serum 0,4 cc reagens te voegen, te mengen, aan te vullen met 96 % alcohol tot 10 cc, na eenige minuten nog eens 0,2 cc reagens toe te voegen en te filteren. De verdunning bedraagt 1 op 10.

Behalve de methode van Hannema, welke op de mengtint van bilirubine-azobilirubine berust, gaan alle andere methoden uit van de vooropstelling der oplosbaarheid in chloroform van vertraagd bilirubine, en der onoplosbaarheid van direct bilirubine; hiermee staan of vallen deze methoden. Verder onderstelt men bij de werkwijze van Grunenberg, de Castro, Varela, Kerppola en Leikola, dat vertraagd bilirubine niet alleen oplosbaar is in chloroform, doch hierin quantitatief overgaat. Dat het laatste niet het geval is, kan men vaststellen, door een vertraagd serum zoo lang met chloroform uit te schudden, tot de chloroform kleurloos is. Het serum is dan nog geel. Indien men nu de chloroform in zijn geheel uit het serum zoo goed mogelijk verwijdt door centrifugeeren, bemerkt men, dat de rest nog steeds vertraagd reageert. Wel is de reactie ervan sneller dan oorspronkelijk het geval was, maar deze versnelling kan men ook opwekken, indien men een weinig chloroform door een vertraagd serum heen schudt (zie bladz. 92). Dit serum-restant, dat niet direct reageert, is door stoffen, die de pH verhoogen, prompt in reactie te brengen, een aanwijzing dat nog vertraagd reagerend bilirubine in de serumrest aanwezig is. Als dat echter het geval is, kunnen de chloroform extractiemethoden geen juiste waarden aangeven. Hoogstens kan men op deze wijze bepalen, welk deel van het bilirubine van een serum in chloroform oplosbaar is en welk deel niet, doch dat deze eigenschap zich dekt met de resultaten omtrent het verschil der bilirubinemodificaties, welke men met de diazoreactie vindt, is niet zeker, zelfs niet waarschijnlijk. Dit bezwaar tegen het principe, waarop de methoden berusten, nog ter zijde gelaten, staat ook de moeilijkheid der bewerking het klinisch gebruik in den weg.

Ook wij hebben omgezien naar een methode om de directe en vertraagde bilirubine, die een serum gelijktijdig bevat, apart te bepalen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van:

1°. De eigenschap van direct bilirubine om in sterk zuur milieu (pH 2) zich prompt te binden met het diazoreagens, wat vertraagd bilirubine zéér langzaam doet (zie hoofdstuk IV). Indien men één volume serum samenbrengt met één volume diazoreagens, dat meer zoutzuur bevat dan het gebruikelijke, treedt het direct reageerende bilirubine terstond in reactie. De zuurgraad van het serum-diazomengsel wordt zoo gekozen, dat de pH ongeveer 2 is. In eenige minuten is dan (zie curve c bladz. 24) het directe bilirubine omgezet; het vertraagde daarentegen heeft bij dezen zuurgraad zeer langen tijd noodig (zie curve c blz. 24). Indien men nu, nadat het serum eenige minuten met het diazoreagens samen is geweest, het door het directe bilirubine gevormde azobilirubine zou kunnen verwijderen, zou in de serumrest slechts het vertraagd reageerende deel overblijven. Dit kan eerst dan tot azokleurstof omgezet worden, wanneer men de pH van het mengsel in de buurt van pH 6 brengt, bijv. met bufferzouten. Indien men dus eenerzijds de uit de directe bilirubine gevormde azokleurstof bepaalt, anderzijds in een tweede proef met hetzelfde serum diazoreagens en een buffer, die de vloeistof in de buurt van pH 6 brengt, de diazokleurstof bepaalt, kan men uit het verschil der concentratie aan azobilirubine de hoeveelheid vertraagd bilirubine door aftrekking berekenen.

Hoe kan nu uit het gedeeltelijk gediazoteerde serum de gevormde azokleurstof verwijderd worden? Hiervoor werd gebruik gemaakt van de eigenschap, dat azobilirubine zich aan neerslagen kan hechten. De methoden, die hiervoor geprobeerd werden, worden hieronder kort weergegeven.

Allereerst werd nagegaan of een neerslag, gevormd door de serumeiwitten, het azobilirubine meesleepte. Het bleek, dat, indien men serum half verzadigde met ammoniumsulfaat, alle azokleurstof aan de globulinefractie gekleefd was. Door wasschen van het neerslag met alcohol was het hieruit weer te verwijderen. Een bezwaar tegen deze methodiek is het geringe verschil in soortelijk gewicht van het eiwitneerslag en de omringende vloeistof, waardoor er veel te lang moest gecentrifugeerd worden. Ook indien het serum eerst verdund werd met physiologische zoutoplossing, werd geen goed resultaat verkregen. Gepro-

beerd werd het gevormde eiwitneerslag te denatureeren, met de bedoeling daarna met water het soortelijk gewicht der ammoniumsulfaatoplossing te kunnen verlagen. Ook dit gaf geen bruikbare resultaten (sulfosalicylzuur, koken enz.). Pyridine aan het serum-ammoniumsulfaatmengsel in kleine hoeveelheid (enkele druppels) toegevoegd, maakte de soort uitvlokking veel grover; het eiwit is nu dadelijk van de vloeistof gescheiden, ligt boven op het ammoniumsulfaat; het eiwit bevat alle azobilirubine, maar, daar de extractie der laatste stof uit het eiwit moeilijkheden gaf, werd deze weg verlaten. De verklaring van dit gedrag der eiwitten valt buiten ons bestek.

Wij trachtten ook een middel te vinden om het soortelijk gewicht der ammoniumsulfaatoplossing te verhoogen, zoodat het globuline-praecipitaat er bovenop kwam drijven. Bij het toevoegen van zeer veel rietsuiker in substantie, of van veel ureum aan het serum-ammoniumsulfaatmengsel, bleken de eiwitten weer in oplossing te gaan. Indien men de ammoniumsulfaatoplossing verzadigde met rietsuiker, zoodat een zeer zware vloeistof ontstond en deze bij het gediazoteerde serum voegde, sloegen de globulinen niet neer; toevoeging van glycerine had hetzelfde resultaat, òf de eiwitten gingen in oplossing, òf, indien de glycerine bij de ammoniumsulfaatoplossing werd gevoegd, sloegen zij niet neer.

Indien neerslagen in serum gevormd werden, bijv. door bariumsulfaat, calciumphosphaat, zilverchloride of met basisch loodacetaat, werden geen bruikbare uitkomsten verkregen, daar slechts een deel van het azobilirubine zich aan het neerslag hechte.

Betere resultaten kregen wij met stoffen, als carbo animalis, kaoline, infusoriënaarde, talk.

Carbo animalis: de scheiding van het serum was hierbij zoo moeilijk, dat deze stof onmiddellijk afviel.

Kaoline: adsorbeerde de azobilirubine noch in zuur, noch in neutraal, noch in alcalisch milieu.

Infusoriënaarde: adsorbeerde azobilirubine niet in alcalisch en neutraal milieu, iets in zure omgeving.

Talcum venetum: adsorbeerde azobilirubine niet in alcalisch

milieu, daarentegen geheel in neutraal of sterk zuur milieu. (Vertraagd reageerend bilirubine zelf hecht geheel niet aan talk. Indien men zeer veel direct reageerend bilirubine bevattende sera met talk schudt, wordt een klein deel van dit bilirubine aan de talk gehecht, echter is het er met water vrijwel geheel uit te wasschen.)

Het azobilirubine, dat zich aan de talk hechtte, was daarvan af te wasschen met alcohol 96%, zoutzuren alcohol, pyridine, alcalisch water. De zoo verkregen oplossing van azobilirubine kan, eventueel na neutraliseeren, in den colorimeter vergeleken worden met een standaardvloeistof. Het gebruik van talk om azobilirubine te adsorbeeren, was reeds aangewend door Terwen¹⁹³⁾ bij zijn methode om het bilirubinegehalte van urine te bepalen, te vinden in de dissertatie van Posthuma¹⁶⁰⁾. Terwen verwijderde de azobilirubine van het talkneerslag met zoutzuren alcohol; de hierbij gevormde blauwe vloeistof zette hij ter colorimetrische vergelijking weer in de roode modificatie om, waarvoor hij de base pyridine bij uitstek geschikt vond, daar deze in overmaat de roode kleur niet bederft en er geen alcalisch azobilirubine ontstaat.

Uit volgende tabel kan men zien, dat sterke vermeerdering der pyridinehoeveelheden de pH der oplossing, indien deze eenmaal ongeveer neutraal geworden is, weinig meer verandert.

1 cc diazoreagens	druppels pyridine	pH
1	0	1,56
	1	5,3
	2	5,92
	3	6,44
	4	6,88
	6	6,9
	10	7,15
	20	7,4

1 cc serum + 1 cc diazoreagens	druppels pyridine	pH
	0	3,35
	2	6,45
	4	7,45
	6	7,71
	8	7,86
	20	8,04

De azobilirubineoplossing, die na pyridinetoevoeging ontstaat, is colorimetrisch vergelijkbaar met den cobaltstandaard, beter echter met de ferrirhodanide in aether. Terloops zij er hier op gewezen, dat deze twee standaardkleurstoffen niet dezelfde tint hebben.

Er wordt nu als volgt te werk gegaan. In twee centrifugeerbuisen A en B wordt 1 volume te onderzoeken serum gebracht, vervolgens in ieder 1 volume diazoreagens ($1/1000 + 30/1000 + 0,3$). Een der buizen (A) blijft zoo eenige minuten staan, waarna men een theelepel talk toevoegt en den inhoud aanvult met zoutzuur van $\pm 1/20$ N. Het mengsel wordt nu ongeveer zestig malen krachtig geschud en daarna twee druppels aether toegevoegd, om het gevormde schuim te verwijderen. Aan buis B wordt één volume 60 % natriumacetaat toegevoegd; de vloeistof kleurt zich dan rood. Na eenige minuten is ook deze koppeling volledig. In de buis wordt talk gebracht en met water aangevuld, 60 malen krachtig geschud, twee druppels aether toegevoegd. Beide buizen worden nu gecentrifugeerd tot alle talk op den bodem ligt. Bij buis B is de bovenstaande vloeistof kleurloos, bij buis A kan zij geel zijn, als naast het directe ook vertraagd bilirubine aanwezig was. Indien de bovenstaande vloeistof nog rood is, moet opnieuw talk worden toegevoegd, geschud en gecentrifugeerd. Beide talkneerslagen worden omgeschud met ruim gedestilleerd water, om verontreiniging met serumbestanddeelen uit de talk te verwijderen. Na centrifugeeren en wegschenken der bovenstaande vloeistof worden de buizen omgekeerd neergezet, om uit te druipen. Indien dit voldoende is geschied,

worden bij beide buizen enkele cc zoutzure alcohol gevoegd, daarna krachtig geschud, afgecentrifugeerd en de zoutzure alcohol, welke nu blauw ziet, afgeschonken. Daarna wordt aan de talk nogmaals zoutzure alcohol toegevoegd, omgeschud en gecentrifugeerd. De blauwe vloeistof wordt bij haar respectievelijke vorige porties gevoegd. Gewoonlijk is tweemaalige extractie voldoende om het talkpraecipitaat wit te maken. Indien dit nog niet het geval is, moet een derde maal geextraheerd worden. Nu wordt bij beide buizen zoutzure-azobilirubine in alcohol eenige druppels pyridine gevoegd, tot de kleur naar rood is omgeslagen. De verkregen vloeistoffen, waarvan het volume gemeten wordt, worden in den colorimeter verder met den standaard vergeleken. De verhouding der colorimeteraflezingen vormt, met inachtneming van de gebruikte volumina, de verhouding tusschen direct en totaal aanwezige bilirubine.

Indien men te maken heeft met sera met weinig bilirubine, gaat men uit van eenige cc serum en verzamelt het verkregen azobilirubine in zoo weinig mogelijk zoutzuren alcohol. Er heeft dan geen verdunning, maar eventueel een concentratie plaats en men zal dus ook de hypobilirubinaemie in onderzoek kunnen nemen. Indien serum daarentegen zeer veel bilirubine bevat, is het gewenscht van te voren ervan een verdunning met physiologische zoutoplossing te maken.

De beschreven methode, waarbij aan een talkneerslag de azobilirubine werd opgenomen, waarna hiervan werd geextraheerd en colorimetrisch bepaald, leent zich ook tot het bepalen van de snelheid, waarmede bilirubine in azobilirubine wordt omgezet. Indien men verschillende buizen inzet, ieder met een weinig serum en diazoreagens en deze met bepaalde tusschenpoozen met talk uitschudt en de aan deze geadsorbeerde azobilirubine bepaalt, krijgt men een reeks getallen, die aangeven hoeveel van het totaal aanwezige bilirubine in een bepaalden tijd is omgezet. Bij vertraagde sera neemt men de tusschenpoozen langer, bij directe sera korter, b.v. 1 of 2 minuten. Zet men de gevonden getallen graphisch uit, dan ontstaat een lijn, waarvan de stijging de snelheid der reactie uitdrukt. Van sera met een mengsel van

de twee bilirubinemodificaties zal de curve eerst steil omhoog loopen en daarna vlakker verder gaan.

Ook het verschil in reactiesnelheid, dat afhankelijk is van het verschil in nitrietgehalte van het diazoreagens, kan men op dezelfde wijze graphisch vastleggen, en eveneens den invloed van de verdunning van het serum met water.

Hartog⁸³⁾, die met een andere methode werkte, maakte van de snelheid der reactie een graphische voorstelling. Hij gebruikte een bicolorimeter. Voor de beschrijving dezer proeven leze men de oorspronkelijke publicatie. Een enkele opmerking dient hierover gemaakt te worden.

Hartog bepaalt de reactiesnelheid in een mengsel van de volgende samenstelling: 1 cc serum + 7 cc phys. zoutoplossing + 2 cc diazoreagens, een geheel andere verhouding dan Hijmans van den Bergh voor zijn kwalitatieve reactie aangaf.

Zooals in het voorgaande is besproken, beïnvloedt de verhouding der componenten de snelheid der reactie, en deze is volgens de kwalitatieve methode een geheel andere dan die welke door Hartog op verzoek van Hijmans van den Bergh werd gemeten. De oorspronkelijke methode is veel sneller, waarvan men zich gemakkelijk kan overtuigen door twee buizen respectievelijk te vullen met:

- a. 1 cc vertraagd serum + 1 cc phys. zout + $\frac{1}{2}$ cc diazo, en
- b. 1 cc vertraagd serum + 7 cc phys. zout + 2 cc diazo.

Na eenigen tijd voegt men aan buis a $7\frac{1}{2}$ cc physiologische zoutoplossing toe, om de volumina gelijk te maken; buis a blijkt dan belangrijk sterker gekleurd te zijn. De door Hartog gemeten reactie-snelheid is dus een geheel andere dan die van een mengsel van de samenstelling zooals Hijmans van den Bergh aangaf voor zijn oorspronkelijke kwalitatieve reactie.

Samenvatting.

Indien wij de verkregen gegevens overzien, zijn de voornaamste resultaten als volgt samen te vatten:

I. De snelheid der diazoteering van bilirubine in serum is afhankelijk van de hoeveelheid diazoniumverbinding. Zoowel door vermeerdering van de hoeveelheid nitriet tot het punt waarop deze aequimoleculair is met het gebruikte sulfanilzuur, als door vermeerdering van de diazoniumverbinding in haar geheel kan versnelling der reactie verkregen worden.

II. De toename der pH van het serum-diazomengsel, dat vertraagd reageerend bilirubine bevat, verhoogt de reactiesnelheid tot $\pm$ pH 5; daarna neemt de snelheid af. Bij sera met direct reageerend bilirubine is de reactie het snelst bij $\approx$ pH 4 en lager; naar boven neemt zij af. Een en ander werd graphisch vastgelegd.

III. Indien de pH van een serum-diazomengsel door buffers wordt gewijzigd, ontstaat een directe reactie in vertraagd serum bij pH $\approx$ 7 tot $\approx$ 5.5, hier beneden wordt de reactiesnelheid kleiner. De werking van een aantal stoffen, die de diazoreactie op bilirubine in bloedserum versnellen, wordt hierdoor verklaard (o.a. salicylas natricus, benzoas natricus, tartaras natricus, enz.). Een reeks versnellende stoffen werd opgegeven, die willekeurig te vergrooten is.

IV. De invloed der buffers op de reactiesnelheid bij het diazoteeren is te danken, behalve aan de verandering der pH, ook aan hun zoutwerking op de serumcolloïden.

V. Deze zoutwerking als factor bij de snelheid van diazoteering bestaat bovendien voor niet-bufferende zouten: deze werking van electrolyten voltrekt zich in de volgorde der anionen van de lyotrope reeks.

VI. Ten aanzien van deze volgorde is het niet onverschillig bij welke pH van het eindmengsel men werkt. Regelmatig volgens de lyotrope reeks gedragen de zouten zich allen van $\pm$ pH 7 tot $\pm$ pH 4,5. Een gedeeltelijke omkeering der volgorde krijgt men daaronder.

VII. Ieder neutraal zout bezit in de door ons gebruikte concentraties een optimum pH, waarbij de snelste diazoteering wordt verkregen. Het merkwaardige feit doet zich voor, dat de volgorde der pH's, voor de verschillende zouten verkregen, wederom die der lyotrope reeks bleek te zijn.

VIII. Verschil in werking der eenwaardige kationen op de snelheid der diazoreactie konden wij niet vaststellen. De meerwaardige gaven ingewikkelder uitslagen.

IX. Wanneer men een waterige bilirubinaatoplossing op de gewone wijze met diazoreagens behandelt, is de reactie sterk vertraagd; prompt wordt deze eerst bij pH 3,7 en hoger. Door buffering kan een directe reactie worden verkregen van $\pm$ pH 10 tot pH $\pm$ 5,8. Ter verklaring van het verschil met het resultaat zonder bufferwerking, wezen wij op een mogelijken samenhang der directe diazoreactie in bilirubinaatoplossing met de mate, waarin bilirubine in water is opgelost.

X. Bij een bespreking der verschillen tusschen direct en vertraagd bilirubine vestigden wij er de aandacht op, dat deze afhankelijk waren van het milieu, waarin de bilirubine zich bevindt. Het gelukte voor eenige verschillen (diazoteeringssnelheid, oxydatiesnelheid, adsorptie aan eiwitten) waarschijnlijk te maken, dat deze door verandering van milieu verkregen konden worden: door verandering of wel van de solvatatie of wel van de lading der serumcolloïden. Verschil in dialyseerbaarheid tusschen direct en vertraagd reageerend bilirubine in bloedserum vonden wij niet. Van een verschil in oplosbaarheid in chloroform konden wij ons niet in alle opzichten overtuigen. Deze oplosbaarheid zal, evenals het al of niet overgaan van bilirubine in de urine, het gevolg zijn van het milieu, waarin deze stof zich bevindt.

XI. Van de theorieën ter verklaring van het verschil in gedrag van het direct en vertraagd reageerende bilirubine in bloedserum voelen wij het meest voor die van Adler en Strausz²⁾, doch

in een geheel gewijzigden vorm. Zij hadden reeds den nadruk gelegd op den toestand der serumeiwitten. Ook de theorie van Griffiths en Kaye ⁷⁰⁻⁷¹⁻⁷²) biedt veel interessants.

Een theorie door ons zelf ontworpen, stelde voorop, dat aan beide verschijningswijzen van het bilirubine slechts één stof ten grondslag ligt. Het verschil in gedrag ten opzichte van diazoreagens enz. wilden wij zien als gevolg van een verschil in solvatatie, respectievelijk dispersiteitsgraad der serumcolloïden. Wij meenen, dat directe reactie gepaard gaat met hooge solvatatie respectievelijk dispersiteit en omgekeerd.

XII. Van de quantitative bilirubinebepalingen is onze opsomming zeker niet volledig. Wij wezen erop, dat de bepaling volgens Hijmans van den Bergh door eenige modificaties verbeterd is. De nieuwe reactie van Hijmans van den Bergh en Grotépass ¹⁰³⁻¹⁰⁴) werd in haar principe besproken. Op enkele zwakke punten daarbij werd gewezen. Het bleek o.a. dat bij de uitvoering daarvan de eenheid van bilirubine niet meer dezelfde was als Hijmans van den Bergh ¹⁰²) in zijn oorspronkelijke methode aangaf.

Vervolgens gaven wij eenige methoden aan, waardoor snel het bilirubinegehalte in serum geschat kan worden.

Een overzicht der methoden om het „direct” en „vertraagd” reageerend bilirubine apart te bepalen werd gegeven. Daar zij, behalve de methode van Hannema ⁷⁷), alle op chloroform-extractie berusten (die voor de scheiding onvoldoende is), verwierpen wij deze werkwijzen. De methode Hannema lijkt moeilijk en is volgens den schrijver zelf niet steeds bruikbaar. Wij gaven een methode aan om deze scheiding tot stand te brengen, berustende op gegevens bij het voorgaande onderzoek verkregen. Hiermede is het mogelijk op een eenvoudige wijze, door telkens de roode verbinding, aan talk geadsorbeerd, aan de vloeistof te onttrekken, de „directe” en „vertraagde” fractie van elkander te scheiden en elks aandeel te bepalen. Ten slotte werden eenige opmerkingen gemaakt over de graphische voorstelling der reactiesnelheid, zooals Hartog ⁸³) deze gaf op aanraden van Hijmans van den Bergh.

Zusammenfassung.

Wenn wir unsere Resultate übersehen, sind die wichtigsten Ergebnisse wie folgt zusammenzufassen:

I. Die Geschwindigkeit der Diazotierung von Bilirubin in Serum ist von der Menge Diazoniumverbindung abhängig. Sowohl durch Vermehrung vom Nitrit bis zu dem Punkt wo dieses aequimolecular ist mit der Sulfanilsäure, sowie auch durch Zusatzvermehrung der Diazoniumverbindung in ihrem Ganzen, kann Beschleunigung der Reaktion erreicht werden.

II. Die Zunahme des pH von Serum-Diazogemisch, das verzögert reagierendes Bilirubin enthält, erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit bis $\text{pH} \pm 5$; danach nimmt die Geschwindigkeit ab. Bei Sera mit direkt reagierendem Bilirubin ist die Reaktion am schnellsten bei pH 4 und weniger, nach oben hin nimmt sie ab. Eins wie das Andere ist graphisch festgelegt worden.

III. Wenn der pH von einem Serum-Diazogemisch durch Puffer geändert wird, entsteht bei $\text{pH} = 7$ bis $\pm 5,5$ eine direkte Reaktion in verzögertem Serum, darunter wird die Reaktionsgeschwindigkeit geringer.

Die Wirkung einer Anzahl Stoffe, die die Diazoreaktion auf Bilirubin im Blutserum beschleunigen, wird hierdurch erklärt (u.a. Natrium-Salicylat, Natrium-Benzoat, Weinsaures Natrium u.s.w.) Eine Reihe beschleunigender Stoffe wurde angegeben, welche willkürlich zu vergrössern ist.

IV. Ausser ihrem Einfluss auf den pH verdankt man die Beschleunigung der Diazotierung bei den Puffersalzen auch ihrer reinen Salzwirkung.

V. Diese Salzwirkung als Faktor bei der Geschwindigkeit der Diazotierung besteht ausserdem für nicht puffernde Salze. Diese Wirkung von Elektrolyten vollzieht sich in der Reihenfolge der Anionen in der lyotropen Reihe.

VI. Zum richtigen Erhalten dieser Reihenfolge ist es nicht gleichgültig bei welchem pH der Endmischung man arbeitet.

Regelmässig nach der lyotrope Reihe betragen sich alle Salze von $\pm$ pH 7 bis $\pm$ pH 4,5. Darunter bekommt man eine teilweise Umkehrung der Reihenfolge.

VII. Jedes neutrale Salz besitzt, in der von uns gebrauchten Konzentration, einen Optimum pH, wobei die schnellste Diazotierung erreicht wird. Es ist eine merkwürdige Tatsache, dass die Reihenfolge der optimum pH's, für die verschiedenen Salze erhalten, wiederum die der lyotrope Reihe zu sein scheint.

VIII. Einen Unterschied in der Wirkung der einwertigen Kationen auf die Geschwindigkeit der Diazoreaktion konnten wir nicht feststellen. Die mehrwertigen Kationen gaben keine einfach zu deutenden Resultate.

IX. Wenn man eine wässrige Bilirubinlösung auf die gewöhnliche Weise mit Diazoreagens behandelt, ist die Reaktion stark verzögert; prompt wird diese erst bei pH 3,7 und höher. Durch Pufferung kann eine direkte Reaktion von $\pm$ pH 10 bis $\pm$ 5,8 erhalten werden. Zur Erklärung des Unterschiedes mit dem Resultat ohne Pufferung, wiesen wir auf einen möglichen Zusammenhang der direkten Diazoreaktion in Bilirubinatlösung mit dem Masse worin Bilirubin in Wasser gelöst ist, hin.

X. Bei einer Besprechung der Unterschiede zwischen direktem und verzögertem Bilirubin, wiesen wir darauf hin, dass diese abhängig waren von dem Milieu worin sich das Bilirubin befand. Es gelang für einige Unterschiede (Diazotierungsgeschwindigkeit, Oxydationsgeschwindigkeit, Adsorbierung an Eiweisskörper) wahrscheinlich zu machen, dass diese durch Veränderung im Milieu verursacht werden können: durch Änderung entweder der Solvation oder der Ladung der Serunkolloide. Unterschiede der Löslichkeit in Chloroform konnten wir uns nicht in jeder Bilirubin in Blutserum fanden wir nicht. Von einen Unterschied in Löslichkeit in Chloroform konnten wir uns nicht in jeder Hinsicht überzeugen. Die Löslichkeit, wie auch das Übergehen von Bilirubin in den Urin, mag die Folge sein von dem Milieu worin sich dieser Stoff vorfindet.

XI. Van den Theorieën zur Erklärung der Unterschiede im

Benehmen von direkt und verzögert reagierendem Bilirubin in Blutserum sind wir am meisten einverstanden mit der von Adler und Strauss²⁾, jedoch in ganz geänderter Form. Bereits sie hatten die Wichtigkeit des Zustandes der Serum-eiweisskörper hervorgehoben. Auch die Theorie van Griffith's und Kaye^{70,71,7)} bietet viel interessantes. Eine Theorie von uns selbst aufgestellt, wies darauf hin, dass beiden Erscheinungsweisen von Bilirubin nur ein Stoff zu Grunde liegt.

Den Unterschied im Benehmen der zwei Erscheinungsformen sehen wir als eine Folge von einem Unterschied in Solvation resp. Dispersitätsgrad der Serumkolloide. Wir meinen, dass direkte Reaktion mit hoher Solvation resp. Dispersität verbunden ist, und umgekehrt.

XII. Von den quantitativen Bilirubin-Bestimmungen ist unsere Zusammenfassung sicher nicht vollständig. Wir wiesen darauf hin, dass die Bestimmung nach Hijmans van den Bergh durch einige Modifikationen verbessert worden ist. Die neue Reaktion von Hijmans van den Bergh und Grotépass^{103,104)} wurde in ihren Grundlagen besprochen. Auf einige schwache Punkte wurde hingewiesen. Es ergab sich u.a., dass bei der Ausführung die Bilirubin Einheit nicht mehr dieselbe war wie Hijmans van den Bergh¹⁰²⁾ in seiner ursprünglichen Methode angab. Weiter gaben wir einige Methoden an, wodurch der Bilirubingehalt im Serum schnell geschätzt werden kann.

Eine Übersicht der Methoden um das „direkt“ und „verzögert“ reagierende Bilirubin, jedes für sich, zu bestimmen, wurde gegeben. Da diese, ausser der Methode von Hannema⁷⁷⁾ nur auf Chloroform-Extraktion beruhen (die für die Trennung unzureichend ist) lehnten wir diese Arbeitsweisen ab. Die Methode von Hannema scheint schwierig zu sein und ist nach seiner Meinung nicht immer brauchbar. Wir gaben eine Methode an um diese Trennung zu Stande zu bringen, fuszend auf den bei der vorhergehenden Untersuchung erzielten Resultaten. Hiermit ist es möglich auf eine einfache Weise, indem man jedesmal die rote Verbindung, an Talkum absorbiert, an der Flüssigkeit entzieht, die „direkte“ und „verzögerte“ Fraktion von einander zu trennen und den Anteil jeder Fraktion zu bestimmen.

Zum Schluss wurden einige Bemerkungen gemacht über die graphische Vorstellung der Reaktionsgeschwindigkeit, wie Hartog⁸³⁾ diese auf Veranlassung von Hijmans van den Bergh gab.

Summary.

Summarising the results of this paper we get the following facts:

I. An increase in the amount of nitrites uptill the quantity aequivalent with the amount of sulfanilic-acid present in the reagent, as well as an increase in the total amount of the diazonium-compound present in the reagent accelerates the reactionvelocity of the diazotation of bilirubin in bloodserum.

II. Bij changing the pH of an delayed reaction serum up till about pH 5 an increase in reaction velocity can be observed. At higher as well as lower pH values of the medium a decrease in reaction velocily takes place. Bij direct reacting serum its reaction-velocity reaches its maximum bij pH about 4,5 and remains practically constant in media with lower pH. Increase of the pH gives a slower reaction.

III. In the presence of buffers the bilirubin reaction of delayed sera, becomes more or less direct in the pH area 7—5,5. This explains the accelerating action of a number of well known substances (the sodium salts of salicylic-, benzoic-, tartaric acid etc.).

IV. The influence of buffers on the reaction velocity can be brought back to two distinct factors:

- a. a change of the pH of the medium ;
- b. a specific effect for every ion on the solvation of the serum-colloids.

V. Apart from these buffers, other electrolytes change the reaction velocity. The order of the accelerating effect of the monovalent electrolytes is the same as the order of the lyotropic series of the negatieve ions on the solvation of colloids



VI. The order of the lyotropic series remains intact over the pH traject 7 to about 4,5. Bij a lower pH a partial reversion of the series is seen.

VII. Every neutral electrolyte has its specific pH of maximal

acceleration bij a given concentration. The order of these pH's for different electrolytes is the same as found in the lyotropic series of the negative ion.

VIII. The univalent positive ions do not show a marked lyotropic effect. The effect of the polyvalent positive ions is more complicated.

IX. An aqueous solution of a salt of pure bilirubin gives a direct reaction only at pH 3,7 or higher. At lower pH values the reaction is strongly delayed. By the action of buffers the area of a direct reaction is changed over to a pH area of about 10—5,8. An explanation of these effects may be found in the solubility of bilirubin in these media.

X. Bij changing the medium viz the colloidal state of the serum-colloids, a change in reaction velocity, oxydationvelocity, adsorption on proteins of the bilirubin in the serum takes place. No marked differences were found between the solubility of direct and delayed bilirubin in chloroform, neither in the dialysability.

XI. Many investigators are inclined to see the differences between direct and delayed bilirubin as caused bij chemical structural differences (Griffiths and Kaye).

According tot our point of view, the differences in reaction velocity between direct and delayed sera must be seen as caused by the different state of solvation of the colloid system in these sera; the bilirubin reaction can be seen as an indicator for the colloidal state of the serum. High velocity of diazotation is caused by high solvation of the colloids.

XII. The procedures for quantitative estimation of the bilirubin content of the serum were discussed. Some faults were found in the new reaction of Hijmans van den Bergh and Grotépass¹⁰³⁻¹⁰⁴). The unit for bilirubin that was given by Hijmans van den Bergh¹⁰²) is not the same as the unit used in his later modification together with Grotépass.

Some methods are given to get a quick estimation of the bilirubin content of sera.

A method, based on the adsorption of the red azobilirubin on talc is given, tot determine the ratio of direct and delayed bilirubin in sera.

LITERATUUR

1. D. Acél und G. Goldgruber.
Über den Mechanismus der Bilirubinreaktion.
Z. Ges. Exp. Med. 84. 1932. 787.
2. E. Adler und L. Strausz.
Beitrag zum Mechanismus der Bilirubinreaktion im
Blutserum.
Z. Ges. Exp. Med. 44. 1924. 1.
3. E. Adler und L. Strausz.
Beitrag zum Mechanismus der Bilirubinreaktion im
Blut.
Kl. W. 1922. 2285. 1923. 932.
4. E. Adler und L. Strausz.
Verh. Deutsch. Ges. inn. Med. 1922. 81.
5. A. Adler.
Verh. Deutsch. Ges. inn. Med. 1922. 72.
6. A. Adler.
Ein neues Colorimeter ohne Vergleichsflüssigkeit.
Kl. W. 1922. 39.
7. A. Adler und E. Meyer.
Über die bei der Bilirubinbestimmung im Serum
nach Hijmans van den Bergh auftretenden Fehler-
quellen und deren Beseitigung (zugleich Angabe einer
colorimetrische Bestimmungsmethodik ohne Vergleichs-
lösung).
Kl. W. 1922. 2468.
8. C. H. Andrewes.
Nature of the difference between the bilirubin of
obstructive and haemolytic jaundice.
Brit. J. Exp. Path. 5. 1924. 213.

9. C. H. Andrewes.
An unexplained diazocolourreaction in uraemic sera.
Lancet 206. 1924. 590.
10. C. H. Andrewes.
A clinical study of van den Bergh's test in jaundice.
Quart. J. Med. 18. 1924. 19.
11. L. Aschoff.
Über Gallenfarbstoffbildung und Gelbsucht.
Kl. W. II. 1932. 1620.
12. L. Aschoff.
Über Bildungs und Ausscheidungsstörungen der Gallenfähigen Substanzen besonders des Gallenfarbstoffs.
Act. Path. Micr. biol. Scand. 5. 1928. 338.
13. Aucher.
Compt. rend. soc. biol. 64. 1908. 297.
14. Bakaltschuck.
Vereinfachte Methode zur quantitativen Bestimmung des Bilirubingehaltes im Blutserum.
Kl. W. 1927. 2263.
15. E. S. Barron.
Bilirubinemia.
Medicine. 1931. 1077.
16. J. Bauer und E. Spiegel.
Über das Bilirubin im Blute und seine pharmacologische Beeinflussbarkeit.
D. Arch. f. klin Med. 129. 1919. 16.
17. G. E. Beaumont and E. C. Dodds.
Recent advances in Medicine.
Churchill. 1931.
18. Bendien en I. Snapper.
Onderzoekingen over de binding van verschillende serumcolloiden met behulp van ultrafiltratie.
Geneesk. Bladen, I. 1933.

19. H. Bennhold.
Über die Vehikelfunction der Serumeiweiskörper.
Erg. inn. Med. und Kinderh. 42. 1932. 274.
20. H. Bennhold.
Untersuchungen über das funktionelle Zusammen-
arbeiten von Plasmaeiweisz und Niere.
Verh. Deutsch. Ges. inn Med. 1933. 357.
21. H. Bennhold.
Über die Anpassung der Serumeiweiskörper an die
Transportnotwendigkeiten im kranken Organismus.
Verh. Deutsch. Ges. inn. Med. 1930. 353.
22. E. H. Bensley.
The renal threshold of bilirubin.
J. Biol. Chem. 103. 1933. 71.
23. E. H. Bensley.
Estimation of plasmabilirubin. A comparative study
of the van den Bergh and Thannhauser and Andersen
procedures.
J. Lab. Clin. Med. 19. 1934. 1122.
24. von Bergman.
Zur functionellen Pathologie der Leber.
Kl. W., I. 1927. 776.
25. A. R. Bernheim.
The icterus index.
J. Am. Med. As. 82. 1924. 5291.
26. M. A. Blankenhorn.
Acholuric Jaundice.
Arch. Intern Med. 19. 1917. 344. 27. 1921. 131.
Ann. Intern. Med. 1. 1927. 74.
27. R. Blum.
Über directe und indirecte Diazoreaction nach Hijmans
van den Bergh.
Med. Kl. 1923. 1608.

28. R. Botzian.
Beiträge zum Bilirubingehalt des menschlichen Serums
bei Gesunden und Kranken.
Mitt. Grenz. Med. Chir. 32. 1920. 549.
29. M. Brulé, H. Garban et Ch. Weismann.
L'étude de la bilirubine du serum sanguin.
Presse méd. XXX. 1922. 986.
30. Campbell.
Cholesterol in the blood in cases of gallstones.
Cholesterol in health and disease.
Quart. J. Med. 1924. 404.
31. U. de Castro.
Neue Methode zur Einzelbestimmung des directen
und indirecten Blutbilirubins.
Z. ges. exp. Med. 67. 1929. 673.
32. U. de Castro.
Sur la conception unitaire et dualiste de la bilirubine
du sang.
Presse Méd. 1929. 1151.
33. U. de Castro.
Blut Liquorschanke und Bilirubin bei Ikterus.
D. Arch. Klin. Med. 170. 1931. 178.
34. E. Chabrol.
Les Ictères.
Masson et Cie. 1932.
35. E. Chabrol, R. Charonnat et A. Busson.
Etude comparative des différentes méthodes choles-
timétriques.
Compt. rend. soc. biol. 107. 1931. 692.
36. M. Chiray et F. Thiebaut.
Un nouveau procédé de dosage de la bilirubine
sanguine par une méthode de Hijmans van den Bergh
modifiée.
Bull et Mém. Soc. Méd. des Hôp. de Paris. 1929. 598.
Presse méd. I. 1929. 642.

37. F. Chrometzka.
Über die Norm des Bilirubinspiegels des Menschen
und die Hyperbilirubinaemie.
Z. ges. exp. Med., 67. 1929. 475.
38. F. Chrometzka.
Über eine Farbreaktion des Serums bei der Urämie,
ihre klinische Bewertung und den ihr zu grunde
liegenden Mechanismus.
Z. ges. exp. Med., 67. 1929. 482.
39. G. A. Collinson and F. S. Fowweather.
An explanation of the two forms of bilirubin demon-
strated by the van den Bergh reaction.
Brit. Med. J., I. 1926. 1081.
40. G. Daddi.
Kongr. Zentbl., 71. 1933. 611.
41. D. T. Davies and E. C. Dodds.
A Study of the properties of pure bilirubin and its
behaviour towards the van den Bergh reagent.
Brit. J. Exp. Path., 8. 1927. 316.
42. G. Dominici en G. Marengo.
Kongr. Zentr.bl., 72. 1933. 636.
43. P. Ehrlich.
Sulfodiazobenzol als Reagens auf Bilirubin.
Z. anal. Chem., 23. 1883. 275.
Z. Klin. Med., 4. 1883. 721.
44. P. Ehrlich.
Über eine neue Harnprobe.
Z. Klin. Med., 5. 1882. 295.
45. P. Ehrlich.
Verhalten des Harns zu Sulfodiazobenzol.
Z. anal. Chem., 23. 1883. 301.
46. Eilbott.
Funktionsprüfung der Leber mittels Bilirubinbe-
lastung.
Z. Klin. Med., 106. 1927. 529.

47. N. W. Elton.
Physiology, correlation, and technic of the van den Bergh reaction, icterus index, and quantitative serum-bilirubin.
J. Lab. Clin. Med. 7. 1931. 1.
48. N. W. Elton.
The mechanism of jaundice: a working hypothesis.
Am. J. Clin. Path. 5. 1935. 1.
49. E. Enriques und R. Sivo.
Neues Verfahren zur Bestimmung des Bilirubingehaltes von Serum und Duodenalsäften.
Biochem. Z., 169. 1926. 152.
50. Z. Ernst und J. Förster.
Über die Bestimmung des Blutbilirubins.
Kl. W. 1924. 2386.
51. Z. Ernst und E. Halley.
Untersuchungen über extra-hepatogene Gallenfarbstoffbildung an überlebenden Organen.
Biochem. Z. 228. 1930. 354.
52. Fahraeus.
Suspensionsstabilität des Blutes. Abderhalden: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.
Blut und Lymphe 1, blz. 374. Abd. IV, 3.
53. G. Favelli.
Kongr. Zentr.bl. 41. 1925. 740.
54. J. Feigl und E. Querner.
Bilirubinämie.
Z. Ges. exp. Med. 9. 1919. 153.
55. Fillinski.
Ueber den Einfluss der Leber auf das Globulin-Albumin-Mischungsverhältnis im Serum.
Wien. Klin. Woch. 41. 1925.
56. K. Fellingner und R. Pfleger.
Zur Physiologie und Pathologie der Bilirubinaemie.
Wien. Arch. inn. Med. 26. 1935. 321.

57. N. Fiessinger et H. Walter.
La bilirubimétrie plasmatique.
Nutrition I. 1931. 1.
58. N. Fiessinger et H. Walter.
Nouveaux procédés d'exploration fonctionnelle du foie.
Paris: Masson et Cie. 1934.
59. N. Fiessinger, V. Jourdain, D. Toissoul.
Contribution à l'étude de la bilirubine dissimulée en
circulation sanguine.
Presse méd., II. 1929. 1245.
60. H. Fischer und Barrenscheen.
Azofarbstoffe des Bilirubins.
Z. phys. Ch., 115. 1921. 94.
61. Formanek.
Vervolg op Pröscher: 'Über Acetophenoazobilirubin.
Z. phys. Ch. 29. 1900. 414.
62. E. Forrai und R. Sivo.
Physikalisch-Chemische Eigenschaften des Bilirubins
in Körperflüssigkeiten.
Biochem Z. 189. 1927. 162.
63. J. Förster.
Über den normalen Wert des Bilirubingehaltes im Blut-
serum.
Kl. W. 1925. 1689.
64. J. Förster und B. Förster.
Über das Blutbilirubin.
Z. klin. Med. 103. 1926. 703.
65. F. Scott Fowweather.
Bilirubin and the van den Bergh reaction.
Biochem. J., XXVI. 1932. 165.
66. L. Frigyer.
Über vergleichende Bilirubinbestimmungen mit der
Methode von E. Herzfeld und H. van den Bergh.
Kl. W., I. 1923. 532.

67. A. Gilbert et Herscher.
La cholémie normale et pathologique.
Compt. rend. soc. biol. 55. 1903. 1587.
68. E. G. Godfried.
The technic to be selected for determination of bilirubin
in blood by the diazomethod.
Bioch. J. 29. 1935. 1337.
69. J. P. Mc Gowan.
The alcali-reserve of the blood in relation to the van
den Bergh bilirubin test.
Edinburgh Med. J., 37. 1930. 28.
(naar Davies en Dodds).
70. W. J. Griffiths and G. Kaye.
A study of the bloodpigment in obstructive jaundice,
with observations on the van den Bergh reaction.
Brit. J. Exp. Path. XI. 1930. 441.
71. W. J. Griffiths and G. Kaye.
A study of the bilepigments in relation to the van den
Bergh reaction.
Biochem J. XXIV. 1930. 1400.
72. W. J. Griffiths.
The isolation from bile of a pigment giving a direct
van den Bergh reaction.
Biochem J. 26. 1932. 1155.
73. K. Grunenberg.
Verh. Deutsch Ges. inn. Med. 1922. 112.
74. K. Grunenberg.
Über die Differenzierung des Serumbilirubins durch
seine Chloroformlöslichkeit.
Z. Ges. Exp. Med. 31. 1923. 119.
75. O. Hammarsten.
Lehrbuch der Physiologischen Chemie, 8e druk.

76. O. Hammarsten.
Über das Vorkommen von Gallenfarbstoff in dem
Blutserum (naar Sivo).
Maly's Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Tierh. 8. 1878. 129.
77. L. S. Hannema.
Verlaufsmodificationen der Diazoreaktionen im Blute
und deren Bedeutung speziell in Beziehung zur Leber-
funktionsprüfung.
Z. Klin. Med. 107. 1928. 700.
78. G. A. Harrison and R. J. Bromfield.
The cause of Andrewes diazotest for renal insufficiency.
Bioch. J. 22. 1928. 43.
79. G. A. Harrison.
Chemical Methods in Clinical Medicine. Churchill. 1930.
80. G. A. Harrop and E. S. G. Barron.
The nature of the van den Bergh reaction..
Trans. ass. Am. Physicians 44. 1929. 143.
(naar Peters and van Slyke)
81. G. Haselhorst.
Eine neue quantitative Bestimmungsmethode von Bili-
rubin im Blutserum.
Münch. med. W., I. 1921. 174.
82. G. Haselhorst.
Zur quantitativen Bilirubinbestimmung im Blutserum.
Münch. med. W., I. 1928. 1076.
83. H. A. Ph. Hartog.
Onderzoekingen over het serumbilirubine.
Academisch Proefschrift. 1935. Utrecht.
84. H. Hayashi.
Etude de la réaction de van den Bergh sur la bilirubine
du sang.
Presse méd. I. 1929. 720.

85. L. Heilmeyer und Krebs.
Spektrophotometrische Untersuchungen des Ehrlich-Pröscherschen Bilirubin-Azofarbstoffes und ihre praktische Anwendung, besonders zur quantitative Bestimmung des Bilirubins im Blutserum.
Biochem. Z. 223. 1930. 352.
86. Hensberg.
Münch. med. W. 1936. No. 24.
87. E. Herzfeld.
Über eine einfache Bilirubinbestimmungsmethode im Blutserum.
Deutsch. Arch. klin. Med. 139. 1922. 306.
88. E. Herzfeld.
Beiträge zur Methodik von quantitativen Bilirubinbestimmungen.
Biochem. Z. 251. 1932. 395.
89. Hetenyi.
Die Functionsprüfung der Leber mittels gleichzeitigen Bilirubinbestimmungen im Blutserum und in der Galle.
Z. klin. Med., 95. 1922. 469.
90. L. Hollos.
Indirekte Reaktion des Bilirubins bei mechanischer Gelbsucht.
Kl. W., II. 1929. 1455.
91. P. Holzer und H. Mehner.
Über quantitative Bilirubinbestimmungsmethoden im Blute.
Kl. W. 1922. 66.
92. C. F. Hoover and M. A. Blankenhorn.
Dissociated Jaundice.
Arch. Intern. Med., 18. 1921. 289.
93. R. S. Hubbard and C. B. Allison.
Comparison of the icteric index and the direct van den Bergh tests.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 26. 1929. 438.

94. G. Hunter.
On the determination of bilirubin by the diazoreagens.
Brit. J. Exp. Path. 11. 1930. 407.
95. G. Hunter.
On the two types of bilirubin diazoreaction in serum
with a hypothesis on the nature of the bilirubin in the
serum from haemolytic jaundice.
Brit. J. Ex. Path. 11. 1930. 415.
96. A. A. Hijmans van den Bergh en I. Snapper.
Die Farbstoffe des Blutserums.
Deutsch. Arch. klin. Med. 110. 1913. 540.
97. A. A. Hijmans van den Bergh und P. Muller.
Über eine direkte und indirekte Diazoreaktion auf
Bilirubin.
Biochem. Z. 77. 1916. 90.
98. A. A. Hijmans van den Bergh.
De la bilirubine dans le plasma sanguin.
Presse méd. I. 1921. 441.
99. A. A. Hijmans van den Bergh und P. Muller.
Nachweis der Gallenfarbstoffe im Blute. Abderhal-
den: Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden:
IV, 4. Blut und Lymphe 2, 901.
100. A. A. Hijmans van den Bergh.
Discussion on Jaundice. British medical Association.
Brit. med. J. 1924.
101. A. A. Hijmans van den Bergh.
Erkrankungen der Milz und Leber in ihren Wechsel-
beziehungen.
Verh. Deutsch. Ges. Verd. Stoffw. Krankh. 1925.
102. A. A. Hijmans van den Bergh, I. Snapper,
P. Muller.
Der Gallenfarbstoff im Blute.
Leipzig. 1928.
103. A. A. Hijmans van den Bergh en W. Grotepass.
Verbeterde methode voor bilirubinebepaling.
Nederl. Tijdschr. Gen. 1934. 259.

104. A. A. H i j m a n s v a n d e n B e r g h and W. G r o t e p a s s.
An improved method for the determination of bilirubin
in blood.
Brit. Med. J. **1934**. 1157.
105. L. J e n d r a s s i k und A. C z i k e.
Bestimmung der Blutbilirubins.
Deutsch. med. W., I. **1928**. 430.
106. L. J e n d r a s s i k und A. C z i k e.
Bestimmung des Bilirubins im Blute.
Z.ges. exp. Med. 60. **1928**. 554.
107. M. J e n k e.
Über die Natur des indirekten Bilirubins.
Verh. Deutsch. Ges. inn. Med. **1931**. 387.
108. N. J u l e s z und E. W i n k l e r.
Studien über das Serum und Gewebssaftbilirubin.
Z.ges. Exp. Med. 87. **1933**. 668.
109. V. J o u r d a i n.
La bilirubinémie en pathologie hépatique.
Ann. bull. Soc. roy. sc. méd. nat. Bruxelles.
No. 9—10. **1932**. 176.
110. R. K a p s i n o w.
A new test for bile pigments in urine, bile and blood-
serum.
J. Am. Med. Assoc. 82. **1924**. 687.
111. V. I. K a r a k o w.
Method of determining bilirubin in bloodserum.
J. Am. Med. Assoc. 103. **1934**. 382.
112. W. K e r p p o l a.
Extraction method for quantitative determination of
bilirubin in different body fluids.
Act. Med. Scand. 76. **1931**. 479.
113. W. K e r p p o l a und E. L e i k o l a.
Über das Wesen der sog. direkten und indirekten
Diazoreaktion und der Anwendung der Reaktionen zur
Bestimmung des Bilirubins.
Act. Med. Scand. 76. **1931**.

114. W. Kerppola und E. Leikola.
Die Bestimmung des Bilirubins in den Körperflüssigkeiten mit seiner Eigenfarbe und die Diazofarbe als Masstab.
Act. Med. Scand. 78. 1932.
115. W. Kerppola und E. Leikola.
Einige weitere Beobachtungen über die Eigenschaften der Gallenfarbstoffe.
Scand. Arch. Phys. 50. 1929.
116. W. Kerppola und E. Leikola.
Über die Löslichkeit des Bilirubins und seine farbigen Oxydationsstufen und über Behandlung mit Reduktions und Kondensationsmittel.
Scand. Arch. Phys. 55. 1929.
117. W. Kerppola und E. Leikola.
Über den Nachweis des Bilirubins und dessen farbigen Oxydationsprodukten und über die quantitative Bestimmung derselben.
Scand. Arch. Phys. 55. 1929.
118. W. Kerppola und E. Leikola.
Die Wirkung der Strahlungsenergie auf das Bilirubin.
Scand. Arch. Phys. 55. 1929.
119. W. Kerppola.
Ein kontrolliertes Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Bilirubins, die Diazofarbe und Eigenfarbe des Serums als Masstab des Bilirubins.
Act. Med. Scan. 89. 1936.
120. Koopmans.
Laboratoriummethoden voor den praktische arts.
Naeff, 1927.
- 120a. A. Krupski und F. Almasy.
Über die kolorimetrische Bestimmung des Serum-bilirubins und die Lichtextinktion des Azobilirubins.
Biochem. Z. 279. 1935. 424.

121. K r u y t.
Inleiding tot de physische chemie.
122. W. K ü s t e r.
Beiträge zur Kenntniss der Gallenfarbstoffe.
Z. phys. Chem. 47. 1906. 294.
123. W. K ü s t e r.
Beiträge zur Kenntniss des Bilirubins und Hämins.
Z. phys. Chem. 82. 1912. 463.
124. W. K ü s t e r.
Beiträge zur Kenntniss der Gallenfarbstoffe.
Z. phys. Chem. 91. 1914. 58.
125. M. L a e m m e r et J. B e c k.
Dosage de la bilirubine dans le sang.
Compt. rend. Soc. biol. 116. 1934. 368.
126. M. L a e m m e r et J. B e c k.
La courbe d'absorption des solutions d'azobilirubine
en fonctions des pH.
Compt. rend. Soc. biol. 116. 1934. 371.
127. G. L e p e h n e.
Untersuchungen über Gallenfarbstoffe im Blutserum
des Menschen.
Deutsch. Arch. klin. Med. 132. 1920. 96.
128. G. L e p e h n e.
Pathogenese des Ikterus.
Ergeb. inn. Med. Kinderheilk. 20. 1921. 221.
129. G. L e p e h n e.
Weitere Untersuchungen über Gallenfarbstoff im Blut-
serum des Menschen.
Deutsch. Arch. klin. Med. 135. 1921. 78.
130. G. L e p e h n e.
Über den Gallenfarbstoff in der Leichengalle.
Deutsch. Arch. klin. Med. 137. 1921.

131. G. Lepehne.
Die klinische Bedeutung des Bilirubins im menschlichen Blutserum.
Deutsch. Med. W. **1923**, 641.
132. E. Leschke.
Diskussion zum Vortrag Ikterus.
Berl. Klin. Woch. **1921**, 848.
133. P. Levi Crailsheim.
Theoretische und experimentelle Untersuchungen über Bilirubin und Fibrinogen im Blut.
Z.ges. exp. Med. 32. **1923**, 468.
134. L. Lichtwitz.
Klinische Chemie.
Springer. **1930**. Berlin.
135. F. C. Mann and J. L. Bollman.
Jaundice.
J. Am. Med. Assoc. 104. **1935**, 371.
136. C. E. May, R. Martindale, W. F. Boyd.
The isolation and detection of bilirubin.
J. Biol Chem. 104. **1934**, 250.
137. E. Mertens.
Farbstoffe des Serums.
Handbuch der Allgemeinen Hämatologie. II. 2. 923.
138. E. Mertens.
Qualitative u. quantitative Bestimmung des Bilirubins.
Handbuch der Allgemeinen Hämatologie. II. 1. **1934**, 619.
139. E. Meulengracht.
Die klinische Bedeutung der Untersuchung auf Gallenfarbstoff im Blutserum.
Deutsch. Arch. kl. Med. 132. **1920**, 285.
140. E. Meulengracht.
Einige Bemerkungen über das Bilirubin-colorimeter.
Kl. W. **1927**, 623.

141. E. Meulengracht.
Ein Bilirubinkolorimeter behufs klinischer Bestimmung
der Bilirubinmenge im Blute.
Deutsch. Arch. klin. Med., 137. **1921.** 38.
142. E. C. Meyer und H. Knüpffer.
Über den Einfluss der Nahrungsaufnahme auf den
Blutbilirubingehalt.
Deutsch. Arch. klin. Med. 138. **1922.** 321.
143. E. C. Meyer und Hienell.
Über den Einfluss des Gallenflusses und der Nahrungs-
aufnahme auf den Bilirubingehalt des Blutes.
Deutsch. Arch. klin. Med. 142. **1923.** 94.
144. E. de Micheli en E. Greppi.
Kongr. Zentrbl. 28. **1923.** 283.
145. G. Monasterio.
Neue Reaktion des Bilirubins im Blutserum.
Kl. W. II. **1930.** 1772.
146. P. Muller.
Klinische Methoden. 1934.
147. P. Muller und L. Engel.
Das spektrale Verhalten des Bilirubins und seine spek-
trophotometrische Bestimmung in Serum.
Verh. Deutsch. Ges. inn. Med. **1931.** 393.
148. P. Muller und L. Engel.
Über die Bestimmung des Gallenfarbstoffes in Blut-
serum.
Kl. W. **1930.** 2304.
149. J. Murakami and H. Nishida.
An examination of bilirubin in the bloodserum.
J. Orient. Med. **1923.** 68.
- 149a. Najib—Farak.
Defensive role of bilirubinaemia in pneumococcal in-
fection.
Lancet. **1937.** 505.

150. J. W. Mc. Nee.
Jaundice: A review of recent work.
Quart. J. Med. 16. **1922**. 390.
151. J. W. Mc. Nee.
Discussion on Jaundice.
Brit. Med. J. **1924**. 495.
152. J. W. Mc. Nee and Ch. S. Keefer.
The clinical value of the van den Bergh reaction for
bilirubin in blood.
Brit. Med. J. **1925**. 52.
153. C. E. Newman.
Bilirubin and the van den Bergh reaction.
Brit. J. Exp. Path. 9. **1928**. 112.
154. M. S. Nichols and J. W. Jackson.
Permanent color standard for bilirubin.
J. Lab. Clin. Med. 15. **1930**. 672.
155. L. Paterni.
Kongr. Zentr.bl. 54, 690.
156. Peters and van Slyke.
Quantitative Clinical Chemistry.
1931—1932.
157. J. R. Peter.
Gesamtfarbstoff und Bilirubin im normalen mensch-
lichen Blutserum.
Bioch. Z. 262. **1933**. 432.
158. G. Piotrowski.
De la bilirubinémie.
Presse méd. **1925**. 1222.
159. G. Piotrowski.
Diazoréactions, directe et indirecte, leur mécanisme.
Arch. d. Maladies de l'App. digest. et de la Nutrition
15. **1925**. 798.

160. S. Posthuma.
De bloedaafbraak en zijn bepaling, in het bijzonder bij
aandoeningen van de lever.
Academisch Proefschrift, Amsterdam. 1931.
161. F. Pröscher.
Über Acetophenoazo-bilirubin.
Z. phys. Chem. 29. 1900. 411.
162. I. M. Rabinowitch.
The renal threshold of bilirubin.
J. Biol Chem. 97. 1932. 163.
163. Baggesgaard Rasmussen.
Indikatorumschlag von Säuren und Basen in alkoho-
lischer Lösung.
Voordracht. 1936. Utrecht.
164. K. Recknagel.
Über die Beziehungen der Eiweiskörper des mensch-
lichen Blutserums zu dessen Farbe unter besonderer
Berücksichtigung d. Verhältnisse bei venöser Stauung
Z. ges. exp. Med. 69. 1930. 439.
165. Retzlaff.
Experimentelle und klinische Beiträge zur Lehre vom
Ikterus.
Verh. Deutsch. Kongr. inn. Med. 1922. 60.
166. Retzlaff.
Zur Pathologie der Ikterus.
Deutsch. med. W. 1923. 844.
167. B. W. Rhamy and P. H. Adams.
A new standard for the van den Bergh test.
J. Lab. Clin. Med. 13. 1928. 87.
168. W. M. Roberts.
Observations on the nature of the v. d. Bergh reaction.
Brit. J. Exp. Path. 9. 1928. 107.

169. W. M. Roberts.
Variations in the phosphatase activity of the blood in disease.
Brit. J. Exp. Path. 11. 1930. 90.
170. W. M. Roberts.
Blood phosphatase and the van den Bergh reaction in the differentiation of the several types of jaundice.
Brit. med. J. 1933.
171. F. Rosenthal und P. Holzer.
Beiträge zur Lehre von den mechanischen und dynamischen Ikterusformen.
Deutsch. Arch. klin. Med. 135. 1921. 257.
172. F. Rosenthal und K. Meyer.
Über den Reaktionstypus des Gallenfarbstoffes und über die quantitativen Verhältnisse von Bilirubin und Cholesterin im Blut bei verschiedenen Ikterusformen.
Arch. exp. Path. Pharmacol 91. 1921. 246.
173. F. Rosenthal und Nossen.
Eine Serodiagnose verschiedener menschlichen Ikterusformen.
Berl. Kl. W. 1921. 1093.
174. F. Rosenthal und Wislicki.
Gallensäure Studien am ikterischen Menschen.
Kl. W. 1927. 781.
175. H. M. Rozendaal, M. W. Comfort, A. M. Snell.
Slight and latent jaundice.
J. Am. med. Assoc. 1935. 371.
176. H. Rusznyak, I. Barat und L. Kürthy.
Untersuchungen über die klinische Bedeutung der Eiweißfraktionen des Blutplasmas.
Z. kl. med. 98. 1924. 337.
177. G. Scherk.
Über den Bilirubinspiegel des Blutes und der Gewebe.
Deutsch med. W. 1928. 477.

178. E. Schiff und H. Eliasberg.
Beobachtungen über Ikterus simplex bei Kindern.
Kl. W. 1922. 1891.
179. H. T. Shattuch, J. H. Kilian and M. Preston.
A Comparison of the quantitative methods for the bilirubin of the blood.
J. Lab. Clin. Med. 12. 1927. 802.
180. H. Shay and E. Schloss.
The van den Bergh reaction. A comparison of technics.
J. Lab. Clin. Med. 15. 1929. 292.
181. R. Sivo.
Der normale Bilirubinspiegel in menschlichen Seren.
Bioch. Z. 189. 1927. 158.
182. R. Sivo und E. Forrai.
Über die Zersetzlichkeit von Bilirubinlösungen, zugleich ein Beitrag zum Bilirubinnachweis im Urin.
Bioch. Z. 189. 1927. 168.
183. H. F. Snider and J. G. Reinhold.
A new interpretation of the van den Bergh reaction.
Am. J. Med. Scien 180. 1930. 248.
184. N. Sofue.
Etude de la réaction de van den Bergh sur la bilirubine du sang.
Presse méd. 1929. 720.
185. M. J. Steenhout et J. P. Bouckaert.
Sur la signification de la reaction directe de Hijmans van den Bergh.
Compt. rend. Soc. biol. 96. 1927. 438.
186. W. Steinbrinck.
Über pathologische Kolloidstabilität, die rechts Verschiebung des Bluteiweißbildes und ähnliches.
Z. kl. Med. 104. 1926.

187. L. Strausz.
Über die klinische Bedeutung der Bilirubinbestimmung
im menschlichen Serum mit besondere Berücksich-
tigung der Gallenblasenerkrankungen.
Deutsch. med. W. **1923**. 376.
188. L. Strausz und E. Adler.
Untersuchungen zum Mechanismus der Bilirubin-
reaktion im Serum bei Erkrankungen des Blutes und
der Leber.
Verh. Deutsch. Ges. inn. Med. **1922**. 81.
189. L. Strausz und W. Buerkman n.
Der Einflusz des Salvarsans auf die Bilirubin-Reaktion
im Blute bei Lueskranken, zugleich ein Beitrag zur
Frage der Salvarsan schädigungen.
Kl. W. **1922**. 1407.
190. K. Takashita.
Beiträge zur Bilirubinreaktion im Blutserum.
Mitt. med. Akad. Kioto 9. **1933**. 750.
191. K. Takashita.
Über die pathologischen Veränderungen der Serum-
eiweissfraktionen und die Beziehung zwischen ihnen
und der Bilirubinreaktion im Blutserum.
Mitt. med. Akad. Kioto. 6. **1932**. 2953.
192. A. J. L. Terwen.
Genootschap voor Nat. Gen. Heelk. Voordracht.
Nederl. T. G. **1928**. 7. Januari.
193. S. J. Thannhauser.
Über die Bildung des Gallenfarbstoffes in mensch-
lichen Organismus.
Kl. W. **1922**. 858.
194. S. J. Thannhauser und E. Andersen.
Methodik der quantitativen Bilirubinbestimmung im
menschlichen Serum.
Deutsch. Arch. klin. Med. 137. **1921**. 179.

195. B. Varela, Fuentes et Recante.
Nouvelle technique simplifiée pour le dosage séparé
des deux bilirubines directe et indirecte des sérums
ictériques.
Compt. rend. Soc. biol. 116. 1934. 1193.
196. B. Varela et J. Esculis.
Nouvelle méthode pour la séparation et le dosage des
deux bilirubines (directes et indirectes) du sérum
sanguin.
Compt. rend. Soc. biol. 107. 1931. 884.
197. B. Verela, E. Apolo et C. Viana.
Resultats obtenus avec la nouvelle méthode pour le
dosage séparé des bilirubines directe et indirecte dans
les sérums ictériques.
Compt. rend. soc. biol. 108. 1931. 1014.
198. A. Vogl und B. Zins.
Eine einfache Methode zum Nachweis pathologischer
Bilirubinaemie.
Med. Klin. 1922. 667.
199. O. Weltmann.
Das Ikterusproblem unter besonderer Berücksichti-
gung des Verhaltens des Bilirubins.
Wien. kl. W. 1929. 811.
200. O. Weltmann und H. Hückel.
Untersuchungen über den Mechanismus der direkten
und indirekten Bilirubinreaktion.
Med. Klin. 1928. 1393.
201. O. Weltmann und H. Hückel.
Weitere Untersuchungen über das direkte und in-
direkte Bilirubin.
Med. Klin. 1929. 560.
202. O. Weltmann und F. Jost.
Über die Adsorption des Bilirubins an das Eiweisz,
ihre Bestimmung und klinische Verwertung.
Deutsch. Arch. klin. Med. 161. 1928. 203.

203. O. Weltmann und F. Jost.
Eine Verbesserung der quantitativen Bilirubinbestimmung.
Med. Klin. 1928. 1125.
204. H. Wespi.
Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung der Bilirubinausscheidung in Urin durch Gallensäure.
Kl. W. 1935. 1820.
205. F. D. White.
On serum bilirubin: I. The diazoreaction as a quantitative procedure.
Brit. J. Exp. Path. 13. 1932. 76.
206. F. D. White.
On serum bilirubin: II. The relationship between the bilirubin content of serum for different types of jaundice and the icterus index of the serum after removal of proteins.
Brit. J. Exp. Path. 14. 1933. 17.
207. P. Wiemer.
Über die direkte und indirekte Diazoreaktion im Blutserum.
Deutsch. Arch. kl. Med. 151. 1926. 154.
208. Yllpoe.
Ikterus neonatorum.
Z. Kinderheilk. 9. 1913. 207.
209. R. Zsigmondy.
Kolloidchemie.
Leipzig. 1918.

